

Zur Primärstruktur der δ -Untereinheit
der mitochondrialen H^+ -ATPase
aus *Neurospora crassa*

Robert Werhahn

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0042

Zur Primärstruktur der δ -Untereinheit
der mitochondrialen H^+ -ATPase
aus *Neurospora crassa*

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Robert Werhahn
Lüdenscheid

München 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Otto
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.1987

Herrn Prof. Bücher bin ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die großzügige Förderung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Hartmann und Herrn Prof. Otto danke ich für ihr Interesse und für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät.

Sehr großen Dank schulde ich Herrn Dr. E. Wachter, dessen Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit mich mit der Bewältigung von biochemischen Fragestellungen vertraut machten. Seine freundschaftliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung waren mir stets eine große Hilfe.

Herrn Dr. Lottspeich (Martinsried) schulde ich Dank für die Durchführung von Abbauten mit dem Flüssigphasensequenzator.

Herrn H. Hofner und Herrn W. Bender und der Werkstatt des Institutes danke ich für die Kooperation und Einsatz, den sie bei der Lösung von technischen Problemen zeigten.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes, die mich während des Fortgangs dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich bedanken.

1. Einführung

1.1. Einführung zur Hauptklausur	1
1.2. Einführung	2
1.2.1. Einführung zur Klausur	2
1.2.2. Einführung zur Klausur	2
1.3. Einführung zur Klausur	2
1.4. Einführung zur Klausur	2
1.5. Einführung	2

2. Grundlagen der Chemie

2.1. Grundlagen	3
2.2. Grundlagen	3
2.2.1. Grundlagen	3
2.2.2. Grundlagen	3
2.2.3. Grundlagen	3
2.2.4. Grundlagen	3
2.2.5. Grundlagen	3
2.2.6. Grundlagen	3
2.2.7. Grundlagen	3
2.2.8. Grundlagen	3
2.2.9. Grundlagen	3
2.2.10. Grundlagen	3
2.2.11. Grundlagen	3
2.2.12. Grundlagen	3
2.2.13. Grundlagen	3
2.2.14. Grundlagen	3
2.2.15. Grundlagen	3
2.2.16. Grundlagen	3
2.2.17. Grundlagen	3
2.2.18. Grundlagen	3
2.2.19. Grundlagen	3
2.2.20. Grundlagen	3
2.2.21. Grundlagen	3
2.2.22. Grundlagen	3
2.2.23. Grundlagen	3
2.2.24. Grundlagen	3
2.2.25. Grundlagen	3
2.2.26. Grundlagen	3
2.2.27. Grundlagen	3
2.2.28. Grundlagen	3
2.2.29. Grundlagen	3
2.2.30. Grundlagen	3
2.2.31. Grundlagen	3
2.2.32. Grundlagen	3
2.2.33. Grundlagen	3
2.2.34. Grundlagen	3
2.2.35. Grundlagen	3
2.2.36. Grundlagen	3
2.2.37. Grundlagen	3
2.2.38. Grundlagen	3
2.2.39. Grundlagen	3
2.2.40. Grundlagen	3
2.2.41. Grundlagen	3
2.2.42. Grundlagen	3
2.2.43. Grundlagen	3
2.2.44. Grundlagen	3
2.2.45. Grundlagen	3
2.2.46. Grundlagen	3
2.2.47. Grundlagen	3
2.2.48. Grundlagen	3
2.2.49. Grundlagen	3
2.2.50. Grundlagen	3
2.2.51. Grundlagen	3
2.2.52. Grundlagen	3
2.2.53. Grundlagen	3
2.2.54. Grundlagen	3
2.2.55. Grundlagen	3
2.2.56. Grundlagen	3
2.2.57. Grundlagen	3
2.2.58. Grundlagen	3
2.2.59. Grundlagen	3
2.2.60. Grundlagen	3
2.2.61. Grundlagen	3
2.2.62. Grundlagen	3
2.2.63. Grundlagen	3
2.2.64. Grundlagen	3
2.2.65. Grundlagen	3
2.2.66. Grundlagen	3
2.2.67. Grundlagen	3
2.2.68. Grundlagen	3
2.2.69. Grundlagen	3
2.2.70. Grundlagen	3
2.2.71. Grundlagen	3
2.2.72. Grundlagen	3
2.2.73. Grundlagen	3
2.2.74. Grundlagen	3
2.2.75. Grundlagen	3
2.2.76. Grundlagen	3
2.2.77. Grundlagen	3
2.2.78. Grundlagen	3
2.2.79. Grundlagen	3
2.2.80. Grundlagen	3
2.2.81. Grundlagen	3
2.2.82. Grundlagen	3
2.2.83. Grundlagen	3
2.2.84. Grundlagen	3
2.2.85. Grundlagen	3
2.2.86. Grundlagen	3
2.2.87. Grundlagen	3
2.2.88. Grundlagen	3
2.2.89. Grundlagen	3
2.2.90. Grundlagen	3
2.2.91. Grundlagen	3
2.2.92. Grundlagen	3
2.2.93. Grundlagen	3
2.2.94. Grundlagen	3
2.2.95. Grundlagen	3
2.2.96. Grundlagen	3
2.2.97. Grundlagen	3
2.2.98. Grundlagen	3
2.2.99. Grundlagen	3
2.2.100. Grundlagen	3

Meiner Mutter

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines zur Energiekonservierung	1
1.2. H ⁺ -ATPasen	10
1.2.1. Struktur und Funktion des F ₀ -Teils	11
1.2.2. Struktur und Funktion der F ₁ -ATPase	15
1.3. Hypothesen zum Mechanismus der ATP-Synthese	29
1.4. Biogenese der H ⁺ -ATPase	31
1.5. Plan	33
2. Material und Methoden	34
2.1. Chemikalien	34
2.2. Methoden	36
2.2.1. Analytische Methoden	36
2.2.1.1. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	36
2.2.1.2. Bestimmung des Proteingehalts	37
2.2.1.3. Dünnschichtchromatographie	37
2.2.1.4. Aminosäureanalysen	38
2.2.1.5. Bestimmung des N-Terminus mit Dansylchlorid	38
2.2.1.6. Bestimmung der N-terminalen Sequenz mit der Methode nach Chang	39
2.2.2. Modifizierung und Spaltung von Peptiden	40
2.2.2.1. Umsetzung von Aminogruppen mit Citraconsäure-anhydrid	40
2.2.2.2. Reduktion von Methioninsulfoxid	40
2.2.2.3. Spaltung mit CNBr	41
2.2.2.4. Spaltung nach Tyrosin	41
2.2.2.5. Spaltung mit Trypsin	41
2.2.3. Reinigung von Proteinen und Peptiden mit säulen-chromatographischen Methoden	42
2.2.3.1. Gelfiltration	42
2.2.3.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	43
2.2.4. Bestimmung der Primärstruktur mit dem Festphasen-Sequenator	44
2.2.4.1. Kopplung der Peptide an den festen Träger	44
2.2.4.1.1. Lactonkopplung	44
2.2.4.1.2. DITC-Kopplung	44
2.2.4.1.3. C-terminale Kopplung	44
2.2.4.2. Sequentieller Abbau der Peptide nach Edman	45
2.2.4.3. Detektion der PTHs	45
2.2.4.3.1. Gaschromatographische Identifizierung	45
2.2.4.3.2. Identifizierung mit dem Massenspektrometer	46
2.2.4.3.3. Identifizierung durch HPLC	46
2.2.5. Präparation von F ₁ -ATPase	47
2.2.5.1. Züchtung von Neurospora crassa-Hyphen (Wildtyp 74A)	47
2.2.5.2. Präparation von Mitochondrien	47
2.2.5.3. Präparation von F ₁ -ATPase	48

3. Ergebnisse und Diskussion	49
3.1. Allgemeines zur Sequenzierung	49
3.2. Allgemeines zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	58
3.2.1. Trennung der PTHs	58
3.2.2. Trennung von Peptiden	61
3.3. Isolierung der δ -Untereinheit aus F_1	70
3.4. Charakterisierung der δ -Untereinheit	82
3.5. Fragmentierung der δ -Untereinheit	85
3.5.1. Reduktion und Spaltung mit CNBr	85
3.5.2. Spaltung nach Tyrosin	90
3.6. Sequenz des-CNBr Peptids CB_4	94
3.6.1. Edman-Abbau des gesamten Peptids	94
3.6.2. Spaltung von CB_4 und Sequenz der Peptide	104
3.6.2.1. Spaltung mit Trypsin	104
3.6.2.2. Sequenz der Spaltpeptide mit noch unbekannter Primärstruktur	106
3.6.2.3. Trennung der tryptischen Peptide mit HPLC	115
3.7. Teilsequenz des CNBr-Peptids CB_{11}	124
3.7.1. Edman-Abbau des gesamten Peptids	124
3.7.2. Spaltung von CB_{11} und Sequenz der Peptide	125
3.8. Vorhersagen zur Sekundärstruktur	129
3.9. Vergleich mit Untereinheiten bakterieller ATPasen	131
3.10. Ausblick	133
4. Zusammenfassung	136
5. Literatur	138
6. Liste der verwendeten Abkürzungen	154

1. Einleitung

1.1. Allgemeines zur Energiekonservierung

In der Zelle ablaufende endergonische Prozesse können in drei Kategorien eingeteilt werden:

1. Biosynthesen, entsprechend der Aufwendung von chemischer Arbeit,
2. Kontraktion und Bewegung, der Form nach mechanische Arbeit und
3. aktiver Transport über Membranen, der als osmotische Arbeit gegen einen Konzentrationsgradienten aufgefasst werden kann.

Die für diese Prozesse notwendige Energie wird im wesentlichen durch das chemische Potential einer Säureanhydridbindung im ATP zur Verfügung gestellt. Die entwicklungsgeschichtlich ältere Möglichkeit der Synthese von ATP aus ADP und P_a erfolgt in der Form der Substratkettenphosphorylierung. Diese ist immer dann möglich, wenn im Rahmen eines katabolen Stoffwechselweges ein Zwischenprodukt auftaucht, dessen freie Enthalpie (bezogen auf die Hydrolyse) größer als die des ATP ist. Bis heute kennt man vier Klassen solcher energiereicher Verbindungen.

1. gemischte Säureanhydride zwischen Carbon- und Phosphorsäuren
2. Enolester der Phosphorsäure
3. Guadininophosphate
4. Thioester

Bei höher entwickelten Spezies, wie z.B. Pflanzen oder aerob lebenden Organismen, hat sich zusätzlich ein weiterer, sehr

viel wirkungsvollerer Weg zur ATP-Synthese entwickelt. Energielieferanten sind hierbei membranständige Prozesse, die durch Redox- und/oder Lichtenergie betrieben werden. Die Verbindung zur ATP-Synthese kann im allgemeinen in drei Schritte unterteilt werden: im ersten Schritt wird die Licht- oder Redoxenergie in eine andere, konservierbare Form umgewandelt, um so in einem zweiten Schritt auf die ATP-synthetisierenden Einheiten übertragen zu werden. Im dritten Schritt findet dann die Umwandlung dieser Energieform zu ATP statt.

	Kopplungsmechanismus		ATP-Pumpmechanismus
	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
I	$\text{AH}_2 + \text{B} + \text{X} \rightleftharpoons (\text{AX})^* + \text{BH}_2$	$(\text{AX})^* + \text{Y} \rightleftharpoons (\text{XY})^* + \text{A}$	$(\text{XY})^* + \text{P}_a + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{X} + \text{Y} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$
II	$\text{AH}_2 + \text{B} \rightleftharpoons \text{A}^* + \text{BH}_2$	$\text{A}^* \rightleftharpoons \text{X}^*$	$\text{X}^* + \text{P}_a + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{X} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$
III	$\text{AH}_2 + \text{B} + 2\text{H}^+_{\text{I}} \rightleftharpoons \text{A} + \text{Br}_{\text{ed}} + 2\text{H}^+ + 2\text{H}^+_a$	Protonenfluß	$2\text{H}^+_a + \text{P}_a + \text{ADP} \rightleftharpoons 2\text{H}^+_{\text{I}} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$

Tab.1 Die drei Schritte der Energiekonservierung im Rahmen der chemischen (I) [Slater 1953], konformativen (II) [Boyer 1965] und chemiosmotischen (III) [Mitchell 1961, 1977] Hypothese am Beispiel der oxidativen Phosphorylierung. In den Schritten 1 und 3 finden jeweils Energietransformationen statt, während Schritt 2 Transmission von Energie beinhaltet. $(\text{AX})^*$ und $(\text{XY})^*$ bezeichnen energiereiche Zwischensubstrate, A^* und X^* symbolisieren Konformationen hoher Energie, H^+_{I} bzw. H^+_a kennzeichnen Protonen in der Matrix des Mitochondriums bzw. im Cytosol.

Es existieren drei Hypothesen, die diesen Ablauf zu erklären versuchen (s.Tab.1). Die in den letzten Jahren erhaltenen

Ergebnisse können im großen und ganzen mit Hilfe der chemiosmotischen Hypothese erklärt werden, deren physikalisch notwendigen Bedingungen von Mitchell formuliert wurden [Mitchell 1961, 1977].

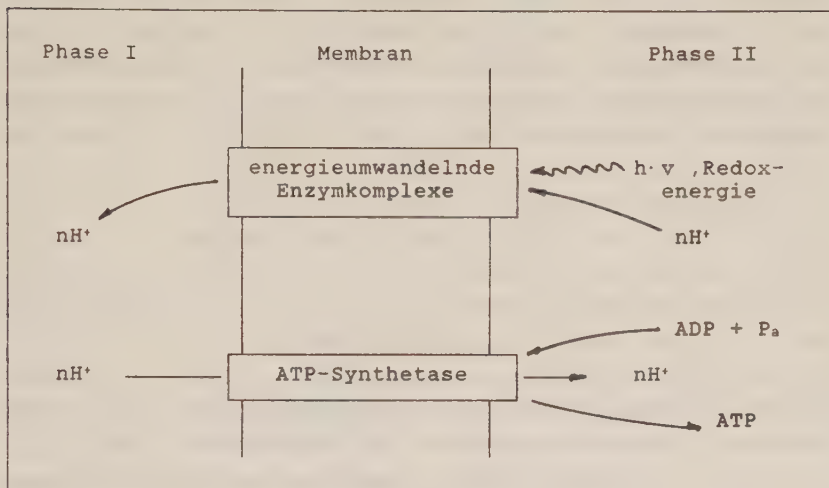


Abb.1 Allgemeines Schema eines chemiosmotischen Systems mit Kopplung an die ATP-Synthetase

Voraussetzung für das Funktionieren eines solchen Systems ist eine für Protonen sowie bestimmte Kationen und Anionen undurchlässige Membran, die zwei wässrige Phasen voneinander trennt (s. Abb. 1). Dies ist bei Prokaryonten die Plasmamembran, während bei Eukaryonten diese Funktion von spezialisierten Zellorganellen übernommen wird: einerseits die Chloroplastenmembran der Pflanzen, die den Thylakoidraum vom Chloroplastenstroma abtrennt, andererseits die innere Mitochondrienmembran, die Grenze zwischen der Matrix und dem Cytosol. Die Komponenten der energiewandelnden Enzymkomplexe sind asymmetrisch in der Membran eingelagert, sie sind damit in der Lage, vektorielle Reaktionen zu katalysieren. Einige von ihnen durchdringen die gesamte Membran, sie sind



häufig zu Multiproteinkomplexen zusammengelagert [Hatefi 1976]. Ebenfalls asymmetrisch eingebaut ist die ATP-Synthetase, ein aus mehreren Untereinheiten aufgebautes Enzym, das die gesamte Membran überspannt [Nelson 1976, Kozlov 1977, Sebald 1977]. Wie aus der Abb.1 ersichtlich, findet synchron zu den mit Licht- oder Redoxenergie betriebenen Reaktionen ein H^+ -Transport durch die Membran statt. Da kein gleichzeitiger Anionentransport erfolgt, wird an der Membran ein elektrochemisches Potential erzeugt ($\Delta \mu H^+$), das aus zwei Komponenten besteht [Mitchell 1968, Walz 1979]:

1. ein Konzentrationsgradient

$$RT \ln ((H^+)_{\text{a}} / (H^+)_{\text{i}}) = Z \Delta \text{pH und}$$

2. ein Membranpotential Φ .

$$\Delta \mu H^+ = \Phi + Z \Delta \text{pH}$$

Die in diesem elektrochemischen Potential konservierte Energie kann neben der Kopplung an die ATP-Synthese (Abb.1) auch noch anderen Zwecken dienen: Transport verschiedener Kationen und Anionen [Azzone et al. 1977, Wulf et al. 1978, Skulachev 1978], Aminosäuren [Palmieri et al. 1977], für die Reaktion der Pyridinnukleotidtranshydrogenase [Rydström 1977], für den ATP/ADP-Gegenaustausch [Klingenberg 1977, 1978], zum Antreiben von Flagellen [Harold 1977]. Erhöhung der Leitfähigkeit der Membran für Protonen, z.B. durch Entkoppler, führt zu einem Zusammenbruch des Potentials, d.h. es können zwar immer noch die durch Licht- und Redoxenergie getriebenen Prozesse ablaufen, doch ist es nicht mehr möglich, die Energietransformation zu ATP durchzuführen (s.Tab.1).

Die freie Verfügbarkeit der H^+ -Ionen beidseits der energietisierten Membran im ursprünglichen Sinne der chemiosmotischen Hypothese gab Anlaß zu Kritik. So gibt es beispielsweise Untersuchungen, bei denen ein durch ATP erzeugter Transfer von Elektronen von Succinat zu NAD durch Hemmung der Energie erzeugenden Reaktionen unterbunden werden konnte (bis zu 60%), ohne daß eine wesentliche Abnahme des Membranpoten-

tials oder des gesamten elektrochemischen Potentials ($\Delta \mu \text{H}^+$) festzustellen war [Sorgato et al. 1980]. Ebenso konnte gezeigt werden, daß eine Absenkung von $\Delta \mu \text{H}^+$ um einen konstanten Betrag durch Entkoppler versus K^+ und Valinomycin völlig verschiedene Effekte für die ATP-Synthese bewirken kann [Zoratti et al. 1982]. Es werden, abweichend von Mitchell, Modelle diskutiert, in denen sich die Protonen in einer energiereichen, dehydratisierten Form im Lipidmilieu der Membran bewegen sollen [Williams 1962, 1978, Robertson & Boardman 1975]. Durch die Dehydratisierung von ADP und P_a im katalytischen Zentrum der ATP-Synthetase zu ATP wäre damit gleichzeitig eine Erklärung für den Reaktionsmechanismus gegeben. Allerdings stellt sich hier die Frage nach den Protonen-leitenden Strukturen innerhalb der Membran. Eine Annäherung zu Mitchell scheint nun in der Vorstellung zu bestehen, daß die Protonen direkt durch an der Oberfläche der Membran liegende Proteinseitenketten abgefangen werden und damit ein lokal begrenzter und direkter Transfer von Energie stattfindet [Mitchell 1977, Rottenberg 1978, Ort 1978, Zoratti et al. 1982, Mandolino et al. 1982].

Im Reich der Bakterien findet sich eine Vielzahl verschiedener Möglichkeiten, einen H^+ -Gradienten an der Plasmamembran zu erzeugen. So findet die Energiekonservierung bei *Halobacterium halobium* mit Hilfe des in der Purpurmembran eingelagerten Bakteriorhodopsin statt [Oesterhelt 1976, Hess et al. 1978]. Dieses Protein nimmt nach Belichtung ein Proton aus dem Cytosol auf und entlässt es über mehrere Zwischenstufen in das Außenmedium, wobei das Rhodopsin wieder in seinen ursprünglichen Zustand zurückkehrt. Eine entsprechend orientierte ATP-Synthetase läßt die Protonen unter Synthese von ATP wieder in die Zelle zurückfließen. Als weiteres Beispiel sei die Redoxkette von *Vibrio succinogenes* erwähnt (s. Abb. 2) [Kröger 1979]: Eine auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisierte Dehydrogenase oxidiert Formiat zu CO_2 und zwei H^+ . Gebunden an Menachion gelangen die beiden Elektronen an die Innenseite der Membran, wo sie an einer Reduktase mit

Fumarat und zwei Protonen zu Succinat umgesetzt werden. Die Gesamtreaktion lautet somit:

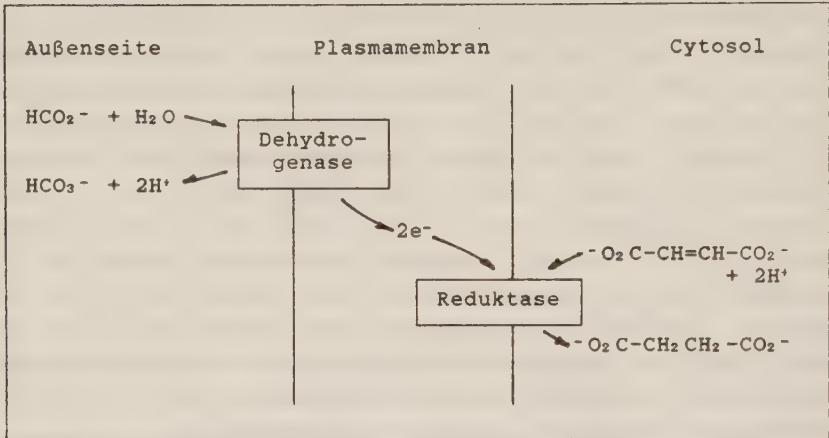
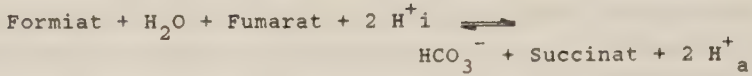


Abb.2 Bildung eines H^+ -Gradienten durch membranständige Redoxsysteme bei *Vibrio succinogenes*

In der Chloroplastenmembran, aber auch in der Plasmamembran photosynthetisch aktiver Bakterien findet im Verlauf der nicht-cyclischen Photosynthese beim Übergang von Photosystem II zu Photosystem I eine H^+ -Translokation statt (Abb.3) [Hauska 1978, Trebst 1974]. Aber auch die Tatsache, daß die H_2O -Spaltungsreaktion innen und die Substratreduktion außen erfolgt, bietet noch eine zusätzliche Möglichkeit der Bildung eines Protonengradienten. Bemerkenswert bei den Chloroplasten ist, daß der Protonenfluß, im Gegensatz zu den Bakterien und den Mitochondrien, von außen nach innen läuft, folglich muß auch die ATP-Synthetase mit der entgegengesetzten Polarität in der Membran lokalisiert sein.

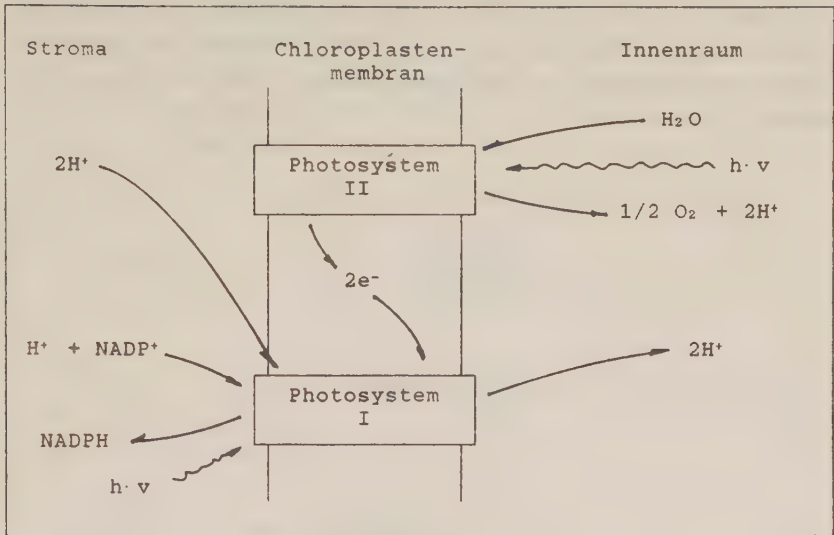


Abb.3 Topologisches Schema der vektoriiellen Elektronen- und Protonenwege in der Chloroplastenmembran bei der nicht-zyklischen Photosynthese

Sehr komplex verlaufen die Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung, wie sie in den Mitochondrien der Eukaryonten und in ähnlicher Form in der Plasmamembran aerober Bakterien stattfindet (s. Abb. 4) [Übersicht bei Boyer et al. 1977, Wilson et al. 1973]. Durch die Oxidation von NADH an Komplex I gelangen zwei Elektronen in die Atmungskette. Sie werden von einem NADH-Ubichinon-Reduktase-Komplex über Ubichinon an Komplex III weitergereicht. Hier gelangen sie über die Cytochrome b und c_1 auf Cytochrom c, von wo aus sie an der Cytochrom-c-Oxidase (Cytochrom a/a_3) auf Sauerstoff übertragen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Einschleusung von Elektronen besteht an Komplex II, an dem Succinat aus der Matrix zu Fumarat oxidiert wird; die Elektronen gelangen hier über Ubichinon zu Komplex III, sie erreichen dann auf dem gleichen Weg wie oben beschrieben den Sauerstoff [Wikström & Krab

1980, Azzi 1980, Capaldi et al. 1983]. Innerhalb der Komplexe I, III und IV finden Redoxsprünge statt, deren Energie ausreicht, um Protonen auf die cytosolische Seite der Membran zu pumpen.

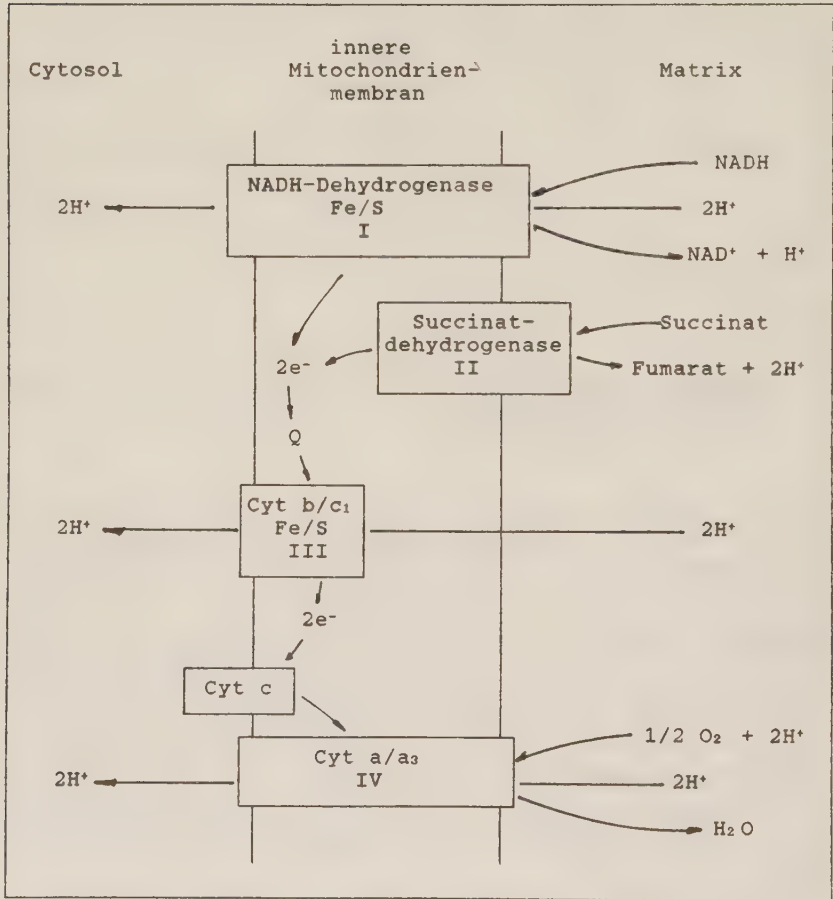


Abb.4 Schema der Kopplung von Elektronen- und Protonenübertragung in der inneren Mitochondrienmembran

Die in Abb.4 angegebenen Stöchiometrien ($6 \text{ H}^+/\text{NADH}$ und $2 \text{ H}^+/\text{ATP}$) wie auch die Natur der Protonenpumpen sind zur Zeit Gegenstand heftiger Diskussion [Wikström 1976, van Gelder et al. 1977, Wikström & Krab 1978, Übersicht bei Boyer et al. 1977, Fillingame 1980, Ferguson & Sorgato 1982].

1.2. H^+ -ATPasen

Das universelle Auftreten energiekonservierender Membranen hat naturgemäß das entsprechende Vorkommen der ATP-Synthetase (EC 3.6.1.3) zur Folge. Sie konnte in den meisten bis heute untersuchten Zellen nachgewiesen werden (mit Ausnahme der Erythrozyten beispielsweise) [Kagawa et al. 1979]. Sie wird in der Literatur entsprechend ihrer Funktion als Bindeglied zwischen der Atmungskette und der Synthese von ATP als "coupling factor" bezeichnet; andere Benennungen sind F_0F_1 [Boyer et al. 1977, Mitchell 1966, Kagawa & Racker 1966a und b, Kagawa et al. 1979], Oligomycin-sensitive ATPase [Pedersen 1975, Tzagoloff et al. 1968, Tzagoloff & Meagher 1971], DCCD-sensitive ATPase [Sone et al. 1975], ATPase-Komplex [Kozlov 1977], Komplex V [Stiggall et al. 1978] oder H^+ -ATPase [Kagawa et al. 1979]. Letztere Bezeichnung soll zeigen, daß dieses Enzym auch reversibel arbeiten kann und es von den Na^+/K^+ - und Ca^{2+} -ATPasen abgrenzen.

Als Kriterien für das Vorliegen einer H^+ -ATPase gelten einmal die irreversible Hemmung durch DCCD und zweitens die leichte Dissoziation in zwei Fraktionen: einen membranintegrierten, hydrophoben Anteil (F_0), der die Eigenschaften eines H^+ -leitenden Kanals in der Membran zeigt und die Bindungsstelle für DCCD enthält, und einen, von der Membran ablösbaren, hydrophilen Multiproteinkomplex (F_1), der in freier Form ATPase-Aktivität zeigt. Die Rekonstitution beider Teile, beispielsweise in künstlich hergestellten Phospholipidvesikeln, ergibt wieder ein System, das nach Anlegen eines H^+ -Gradienten an der Membran ATP synthetisieren bzw. diesen Gradienten durch Hydrolyse von ATP aufbauen kann.

1.2.1. Struktur und Funktion des F_0 -Teils

Der gesamte Komplex (F_0F_1) kann unter anderem mit Hilfe von immunologischen Methoden oder Detergentien isoliert werden [Ryrie 1975, Serrano et al. 1976, Pick & Racker 1979, Sone et al. 1978, Foster & Fillingame 1979, Friedl et al. 1979, Sebald & Wild 1979, Tzagoloff 1979, Übersicht bei Senior 1979]. Unabhängig vom Organismus oder von der Isolierungsmethode zeigen sich in der Zusammensetzung der Untereinheiten große Ähnlichkeiten, insbesondere im F_1 -Teil, während die der Proteine des Membransektors (F_0) eher spezieabhängig Unterschiede aufweisen. Die Frage nach der für die Funktion notwendige Minimalzusammensetzung konnte bisher nur für bakterielle ATP-Synthetasen befriedigend gelöst werden. So gelang es sowohl bei dem thermophilen Bakterium PS3 [Kagawa 1978] wie auch bei *Escherichia coli* [Sternweis 1978, Sternweis & Smith 1977, Dunn & Futai 1980], das Enzym schrittweise aus seinen gereinigten Untereinheiten zu rekonstituieren und die Funktion der einzelnen Komponenten zu studieren. Danach konnte bei beiden für F_0 eine Zusammensetzung aus drei verschiedenen Proteinen angenommen werden, während für F_1 fünf verschiedene Untereinheiten notwendig sind. Ein neuer Aspekt in dieser Frage wurde von zwei Arbeitsgruppen aufgeworfen, denen es unabhängig voneinander gelang, die komplette Basensequenz des für die ATP-Synthetase codierenden Gens (unc- oder atp-Operon) zu bestimmen [Gay & Walker 1981a, 1981b, Saraste et al. 1981, Mabuchi et al. 1981, Kanazawa et al. 1981a, 1981b, 1982b, Nielsen et al. 1981]. Sie fanden zusätzlich zu den Strukturgenen der oben erwähnten acht Untereinheiten ein weiteres, das für ein hydrophobes Protein mit einem Molekulargewicht von 14183 codieren könnte, und keiner der bis dahin bekannten, auf proteinchemischem Weg isolierten Komponenten zugeordnet werden kann. Es wird diskutiert, daß es als Pilot-Protein während der Assemblierung des Membransektors fungieren könne [Gay & Walker 1981b].

Die bisher am besten charakterisierte Untereinheit des F_0 -Teils ist die Untereinheit c, auch als DCCD-bindendes Protein bezeichnet, die aufgrund ihrer extrem hydrophoben Natur (mehr als 75% hydrophobe Aminosäuren [Sebald et al. 1979a]) auch als Proteolipid bezeichnet wird. Sie kann mit Hilfe von Mischungen aus $CHCl_3$ und Methanol aus der Membran isoliert werden [Fillingame 1976, Graf & Sebald 1978]; die auf der $NaDodSO_4$ -Gelelektrophorese bestimmten Molekulargewichte bewegen sich zwischen 8000 und 10000. Die bei sechs verschiedenen Spezies ermittelten Primärstrukturen zeigen, trotz der großen entwicklungsgeschichtlichen Unterschiede (Mitochondrien vom Rind, Schimmelpilz und Hefe, Spinatchloroplasten, Plasmamembran von *E. coli* und PS3) eine sehr hohe Homologie [Sebald et al. 1979b]. Dies wird als Hinweis gewertet, daß dieses Protein in der Energietransformation eine zentrale Rolle spielen muß. Als Bindungsstelle für DCCD konnte bei allen ein saurer Aminosäurerest im letzten Drittel der Proteinkette (Asp bei *E. coli*, Glu bei allen anderen [Sebald et al. 1980]) nachgewiesen werden. Für das Proteolipid aus dem roten Brotschimmel *Neurospora crassa*, das bei diesem Eukaryonten im Zellkern codiert ist und daher durch das Cytosol in das Mitochondrium transportiert werden muß, konnte erstmalig die Sequenz einer wasserlöslichen Vorstufe eines Membranproteins ermittelt werden. Demnach trägt das in seiner nativen Form 81 Aminosäuren lange Protein in seiner löslichen Form als Preproteolipid eine N-terminale, sehr hydrophile Verlängerung von 66 Aminosäureresten, die einen hohen Anteil von basischen Aminosäuren (ca. 20%), aber weder Glu noch Asp enthält [Viebrock et al. 1982].

Rekonstitution von reinem Proteolipid aus Chloroplasten in künstliche Vesikel, die als Protonenpumpe gleichzeitig Bakteriorhodopsin enthielten, ergaben eine deutlich erhöhte H^+ -Leitfähigkeit der Membran [Nelson et al. 1977], ähnliche Resultate konnten bei dem thermophilen Bakterium PS3 erhalten werden [Okamoto et al. 1977]. Bei *E. coli* allerdings stellte sich heraus, daß für den Aufbau des H^+ -Kanals zusätzlich die

Anwesenheit eines weiteren Membranproteins von F_0 mit Molekulargewicht 19000 (Untereinheit b) erforderlich ist [Loo & Bragg 1981]. Dieses Protein, dessen Primärstruktur durch die ermittelte DNS-Sequenz bekannt ist, (156 Aminosäuren, Molekulargewicht 17212 [Gay & Walker 1981b, Kanazawa et al. 1981b]), hat einen deutlich amphipatischen Charakter. In den ersten 32 Positionen enthält die Proteinkette lediglich eine geladene Aminosäure (Lys²³), ein Hinweis dafür, daß dieser Teil in der Membran eingebettet liegt, während der Rest des Moleküls als Anker für die Bindung des F_1 -Teils dienen könnte. Bewiesen wurde diese Funktion bei PS3, bei dem erst das Proteolipid zusammen mit der Untereinheit b in der Lage ist, F_1 an die Membran zu binden. Die Autoren folgern daraus, daß genetisch F_0 aus mindestens zwei Proteinen zusammengesetzt sein muß [Gibson et al. 1977].

Rekonstitutionsexperimente mit BF_0 lassen für das dritte Protein, die Untereinheit a aus dem Membransektor (Molekulargewicht 30267, 71% hydrophobe Aminosäuren bei *E. coli* [Gay & Walker 1981b, Kanazawa et al. 1981b]) zumindest eine Teilfunktion erkennen, diese könnte in einer zusätzlichen Fixierung von F_1 an die Membran bestehen [Friedl et al. 1983]. Für den Transport von H^+ -Ionen scheint diese Untereinheit zumindest bei PS3 nicht notwendig zu sein [Sone et al. 1978].

Untersuchungen zur Stöchiometrie von F_0 (homogener Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren, Kinetiken der Hemmung mit DCCD, Genorganisation) ergaben für *E. coli* a:b:c = 1:2:ca.10 [Foster & Fillingame 1982], bei PS3 ein Verhältnis von a:b:c = 1:2:3-6 [Kagawa 1982], bei den Chloroplasten scheinen fünf Kopien des Proteolipids pro F_0 vorzuliegen [Nelson et al. 1977], während bei Mitochondrien die Vorstellung eines etwa hexagonalen Kanals bestehend aus sechs Untereinheiten favorisiert wird [Sebald et al. 1979a].

Die ATPase der Mitochondrien ist im Gegensatz zu den anderen neben DCCD auch durch das Antibiotikum Oligomycin hemmbar [Kagawa & Racker 1966a, Tzagoloff 1969]. Als Angriffsort wird

hier ebenfalls das Proteolipid vermutet, allerdings bildet Oligomycin im Gegensatz zu DCCD keine kovalente Bindung mit einem Aminosäurerest aus und erschwert dadurch den direkten Nachweis [Enns & Criddle 1977]. Gemeinsam ist beiden Inhibitoren, daß sie den H^+ -Fluß an von F_1 befreiten Membranen vollständig aufheben können. Dabei genügt es im allgemeinen, von den fünf bis sechs Proteolipiden eines mit DCCD umzusetzen, um eine komplette Hemmung zu erzielen [Graf & Sebald 1978, Sebald et al. 1979a].

Es ist schwierig, die Rolle des Proteolipids als Protonenleiter im Rahmen bisher entworfener Modelle zu verstehen. Ein möglicher Mechanismus fordert das Auftreten von polaren Aminosäuren, die eine Kette von Wasserstoffbrücken über die Membran ermöglichen [Nagle & Morowitz 1978], bzw. eine hydrophile Pore bilden, in der Wassermoleküle aneinandergereiht die Membran durchdringen [Birktoft & Blow 1972]. Betrachtet man die invarianten polaren Reste in den bis jetzt bekannten Primärstrukturen, so ist es nicht möglich, selbst bei einer hexameren Anordnung, die theoretisch benötigten 10 bis 20 Wasserstoffbrücken zu konstruieren. Auf der anderen Seite zeigt ein Vergleich mit der DCCD-reaktiven COOH-Gruppen aus der Cytochrom c-Oxidase [Prochaska et al. 1981], bei der dann ebenfalls der H^+ -Transport blockiert wird, daß hier strukturelle Ähnlichkeiten bestehen [Azzi 1980, Sebald & Hoppe 1981].

Die Schwierigkeit, Funktion und Struktur eines membranständigen Proteinkomplexes zu studieren und zu verstehen, liegt nicht zuletzt in der Problematik begründet, Membranproteine in einer nativen Form rein aus der Membran zu gewinnen. Besser charakterisiert ist dagegen der wasserlösliche Anteil der H^+ -ATPasen, F_1 oder lösliche ATPase genannt.

1.2.2. Struktur und Funktion der F_1 -ATPase

Die systematische Suche nach F_1 setzte ein, als man entdeckte, daß mechanisches Aufbrechen von Mitochondrien die oxidative Phosphorylierung in zwei Fraktionen separieren konnte. Der membranständige Anteil war weiterhin in der Lage, Substrate wie NADH und Succinat zu oxidieren, während der wässrige Überstand ATPase-Aktivität enthielt. Zusammengeben der beiden Fraktionen stellte die atmungsabhängige Phosphorylierung wieder her. 1960 gelang es der Arbeitsgruppe von Racker erstmals, F_1 aus Rinderherzmitochondrien rein darzustellen [Pullman et al. 1960]. In den darauf folgenden Jahren konnten F_1 -ATPasen in einer Reihe von Organismen und Zellen nachgewiesen werden. Tab.2 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Präparationen, sie erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern soll die weite Verbreitung wie auch Ähnlichkeiten und Unterschiede der einzelnen H^+ -ATPasen illustrieren. F_1 ist identisch mit den elektronenoptisch darstellbaren, sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser von 9 bis 10 nm an der Oberfläche energietransduzierender Membranen, wie durch Verwendung von 3H -acetyl- F_1 bewiesen werden konnte [Kagawa & Racker 1966c].

Laut Senior ist zwar ein "gemeinsames Merkmal aller Präparationen für F_1 ein exzessiver Aufwand an Zeit und Mitochondrien" [Senior 1979], doch läßt sich das Enzym im allgemeinen leicht von der Membran ablösen: so genügt bei den meisten bakteriellen ATPasen das Waschen der Membranen mit EDTA und/oder Puffern niedriger Ionenstärke [Übersicht bei Muñoz 1982], was letztendlich eine gewisse Beteiligung zweiwertiger Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) für die Bindung an F_0 widerspiegelt.

	α	β	γ	δ	ε	
Mitochondrien	63-53	57-49	39-25	18-12.5	12.5-5.5	
Rinderherz	54	50	33	17.3	11/5.7	[1]
Rattenleber	62	57	36	12	7.5	[2]
<i>N. crassa</i>	59	56	36	15	12	[3]
Rinderhirn	51	50	28	-	-	[4]
Hefe	56	52	32	13.7	9.6	[5]
	58.5	55	34	10	8.6	[6]
Chloroplasten						
Spinat	59	56	37	17.5	13	[7]
Bakterien						
<i>Rhodosp.r.</i>	54	50	32	13	7.5	[8]
<i>E.coli</i>	56	54	32	13	11.5	[9]
	58	52	31	20	13	[10]
	55.246	50.157	31.410	19.310	14.194	[11]
<i>M.lysod.</i>	52.5	47	41.5	28.5	-	[12]
<i>S.faecalis</i>	51	47	37(nectin)	-	-	[13]
PS3	56	53	32	15.5	11.1	[14]
<i>M.phlei</i>	64-54	53-51	46	30	17	[15]
<i>Cl.pasteur.</i>	65.5	57.5	43	-	-	[16]
<i>B.megaterium</i>	68	65	-	-	-	[17]
<i>L.casei</i>	43	-	-	-	-	[18]

Tab.2 Molekulargewichte und Zusammensetzung der Untereinheiten löslicher ATPasen aus verschiedenen Organismen

Ref.: [1] Knowles & Penefsky 1972b, [2] Catterall et al. 1973, [3] Wild 1980, [4] Apps & Glover 1978, [5] Todd et al. 1980, [6] Takeshige et al. 1976, [7] Harold 1977, [8] Johansson & Baltschefsky 1975, [9] Vogel & Steinhart 1976, [10] Wilson & Smith 1977, [11] Mabuchi et al. 1981, Kanazawa et al. 1981a, Gay & Walker 1981a & b, Saraste et al. 1981, [12] Höckel et al. 1976, [13] Abrams & Smith 1974, [14] Kagawa et al. 1976, [15] Muñoz 1982, [16] Clarke et al. 1979, [17] Mirsky & Barlow 1971, Ishida & Mizushima 1969, [18] Biketov et al. 1982

Ähnliches gilt für die Isolierung aus Chloroplasten [Strotmann et al. 1973, Karu & Moudrianakis 1969], während bei den ATPasen mitochondrialen Ursprungs eher hydrophobe Wechselwirkungen für die Bindung an die Membran verantwortlich zu machen sind. Anreicherung von MF₁ durch zunächst alleinige mechanische Behandlung der Membranen (Schütteln mit Glaskugeln [Pullman et al. 1960, Penefsky et al. 1960] oder

Anwendung von Ultraschall [Horstman & Racker 1970, Senior & Brooks 1970, Knowles & Penefsky 1972a]) konnte durch zusätzliches Ausschütteln mit CHCl_3 [Beechey et al. 1975] sehr viel effizienter gestaltet werden. Im Falle von *Neurospora crassa* konnte im Vergleich gezeigt werden, daß die direkte Behandlung von Mitochondrien mit CHCl_3 die beste Anreicherungs-methode darstellt [Wild 1980]. Durch anschließende Reinigung mittels Ionenaustauscher und/oder Molekülsiebchromatographie kann eine auf der Gelelektrophorese reine F_1 -Fraktion erhalten werden [Pedersen 1975, Nelson 1976, Sebald & Wild 1979].

Die Molekulargewichte der reinen löslichen ATPase bewegen sich im allgemeinen zwischen 3.2 und 4.0×10^5 , abhängig von Spezies und der angewandten Methode (z.B. Gelelektrophorese, Gleichgewichtssedimentation [Farron 1970], Kleinwinkelröntgenstreuung [Paradies et al. 1978], Lichtstreuung [Moroney et al. 1983]). Einige bakterielle, offenbar einfacher gebaute F_1 -ATPasen weisen jedoch auch niedrigere Molekulargewichte auf (s.Tab.2). Lediglich bei den Enzymen aus Chloroplasten und *Micrococcus lysodeikticus* konnten als Nichtproteinanteil Kohlehydrate nachgewiesen werden [Andrew et al. 1977, 1978]. CF_1 [Bennum & Racker 1969, Livne & Racker 1969, Lien et al. 1972] und in noch stärkerem Maße MF_1 [Penefsky & Warner 1965] zeigen das seltene Phänomen der Kälteelabilität, der Multiproteinkomplex zerfällt dabei in mehrere Subkomplexe. Bei den bakteriellen F_1 -ATPasen dagegen lassen sich übergangslos alle Möglichkeiten zeigen: ein Extrem ist am Beispiel des *Bacillus megaterium* gegeben, dessen lösliche ATPase sich als sehr kälteelabil erweist [Mirsky & Barlow 1972], andere dagegen, wie z.B. *Micrococcus lysodeikticus*- F_1 , sind in der Kälte stabil, letzteres kann sogar durch Inkubation bei 4°C deutlich aktiviert werden [Muñoz 1982].

Nach Dissoziation des F_1 -Komplexes in seine Untereinheiten und deren Trennung auf der NaDodSO_4 -PAGE erhält man in der Regel fünf nicht identische Proteine mit apparenten Molekulargewichten zwischen 65000 und 6000 (s.Tab.2). Diese werden gemäß Konvention mit abnehmendem Molekulargewicht α , β , γ , δ

und ϵ benannt. Das Fehlen der kleineren Untereinheiten in manchen Präparationen kann einerseits durch die Art der Isolierung bedingt sein, (Zerstörung durch proteolytischen Abbau, teilweise Dissoziation der Untereinheiten aus F_1) [Hanson & Kennedy 1973, Nelson et al. 1974], andererseits ist es z.B. an der *Bacillus*-Spezies gezeigt worden (s.Tab.2), daß diese "Minimal-ATPasen" wieder an F_0 -haltige Membranen zu funktionsfähigen Einheiten rekonstituiert werden können und somit die notwendige minimale Zusammensetzung aufweisen [Mirsky & Barlow 1971, Ishida & Mizushima 1969]. Eine der einfachsten Strukturen zeigt die F_1 -ATPase von *Lactobacillus casei*: sie besteht aus sechs, nach Gelelektrophorese und isoelektrischer Fokussierung identischen Untereinheiten zu je 43000, die im Molekül in hexagonaler Form angeordnet sind [Biketov et al. 1982]. Da dieser Organismus ein obligater Anaerobier ist und daher bei ihm die Enzyme der Atmungskette fehlen, verwendet er die H^+ -ATPase ausschließlich zum Errichten eines Protonengradienten an der Plasmamembran, das hierfür benötigte ATP muß durch Substratkettenphosphorylierung bereitgestellt werden. Es könnte sich damit um einen Urtyp der F_1 -ATPase handeln. In diesem Fall konnte zusätzlich gezeigt werden, daß bereits das Anlegen von nur einer Komponente des elektrochemischen Potentials, nämlich des Membranpotentials (mit K^+ und Valinomycin), ausreicht, um aus der ATP-Hydrolase eine ATP-Synthetase zu erhalten.

Zur Frage der Stöchiometrie konnte bisher lediglich bei den bakteriellen ATPasen eine befriedigende Antwort gegeben werden, hier, wie auch vermutlich in den Mitochondrien, wird ein Verhältnis der Untereinheiten von $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ angenommen [Fillingame 1981, Amzel 1981, Kagawa 1982, Foster & Fillingame 1982].

Elektronenoptische Bilder von BF_1 lassen auf eine hexagonale Anordnung der Untereinheiten schließen [Pedersen 1975], auch die röntgenographische Analyse zweidimensionaler Kristalle des sehr stabilen F_1 aus PS3 zeigen eine annähernd hexagonale Struktur [Wakabayashi et al. 1977]. Damit wird einer Stöchio-

metrie von $\alpha_3\beta_3\tau\delta\epsilon$ der Vorzug gegeben. Dagegen zeigen Röntgenpräzessionsaufnahmen von MF_1 -Kristallen (aus Rinderherz [Paradies 1980, Spitzberg & Haworth 1977], aus Rattenleber [Amzel et al. 1982, Amzel & Pedersen 1978]) das Vorliegen einer zweizähligen Drehachse, ein Hinweis dafür, daß hier die lösliche ATPase aus zwei annähernd gleichen Hälften aufgebaut ist. Die Autoren räumen ein, daß je zwei α - und zwei β -Untereinheiten äquivalente Positionen einnehmen können, je eine weitere kann, möglicherweise mit geänderter Konformation, in einer nicht gleichwertigen Umgebung sitzen, vorgeschlagen wurde eine Form $\alpha_2\beta_2(\beta\tau)(\alpha\delta\epsilon)$. Diese Hypothese ist im Hinblick auf Bindungsstudien mit F_1 -spezifischen Inhibitoren bemerkenswert. So bindet das Antibiotikum Aurovertin, als dessen Angriffsort die β -Untereinheit nachgewiesen werden konnte, mit einer Stöchiometrie von zwei Mol pro Mol F_1 [Chang & Penefsky 1973, Verschoor et al. 1977].

Der Vorteil, das stabile BF_1 des thermophilen Bakteriums PS3 trotz Anwendung von potentiell denaturierenden Mitteln in biologisch aktive Untereinheiten zerlegen zu können, erlaubt hier sicher die exakteste Aussage. Zusätzlich kann hier, wie auch bei allen anderen bakteriellen löslichen ATPasen und CF_1 , die Möglichkeit einer homogenen radioaktiven Markierung genutzt werden, eine Methode, die verlässlichere Werte ergeben sollte. Läßt man Bakterien oder Pflanzen in Gegenwart von radioaktiv markiertem Substrat wachsen (z.B. $^{35}SO_4^{2-}$ oder $^{14}CO_2$), so findet sich diese Markierung unter anderem in den Proteinen wieder. Nach Isolierung des F_1 und Trennung in seine Untereinheiten können deren relative molaren Relationen ermittelt werden. So konnte für PS3 [Kagawa et al. 1976] wie für *E. coli* [Bragg & Hou 1975] die Zusammensetzung 3:3:1:1:1 ermittelt werden.

Auf Grund der Experimente mit radioaktiven Substraten wie $^{14}CO_2$ [Nelson 1976], aber auch Studien mit Quervernetzern [Baird & Hammes 1976] und Bindung von Farbstoffen [Binder et al. 1978] wurde bei den Chloroplasten lange Zeit einer Zusammensetzung von $\alpha_2\beta_2\tau\delta\epsilon_2$ der Vorzug gegeben. Allerdings zeigen

neuere Arbeiten, bei denen das gesamte CF_1 sowohl über Rayleigh-Streuung wie auch Gleichgewichtssedimentation bestimmt wurde, daß die bis dato veröffentlichten Werte für die gesamte Molekularmasse von F_1 zu niedrig angenommen wurden, bei einem M_r von 400000 ist hier auch eine Stöchiometrie von $\alpha_3\beta_3\tau\delta\epsilon$ möglich [Moroney et al. 1983].

Die Problematik bei der Ermittlung der stöchiometrischen Verhältnisse in F_1 zeigt sich nicht nur darin, daß die zwei kleinen Untereinheiten, δ und ϵ , jeweils nur ca. 3 bis 6 Gew.% des gesamten Komplexes ausmachen und daher ihre Bestimmung im vorneherein mit einem gewissen Fehler behaftet ist. Einige Autoren gehen daher so weit, für die Angaben der molaren Relationen nur α , β und τ in Betracht zu ziehen [Penefsky 1979]. Auch die Instabilität vieler F_1 -ATPasen, die sich in der leichten Dissoziation, speziell der kleinen Untereinheiten [Bragg et al. 1973, Knowles & Penefsky 1972a, Lien & Racker 1971], wie auch in der Zerstörung einzelner Untereinheiten durch endogene Proteasen während der Präparation [Bragg & Hou 1979] zeigt, können die Ursache für eine nicht exakte Berechnung der Stöchiometrie sein. Schließlich bleibt die Frage, ob sich Artunterschiede, trotz sehr ähnlicher Funktion, nicht doch in der Quartärstruktur dieses Multiproteinkomplexes widerspiegeln (Bakterien - Chloroplasten, Mitochondrien - Chloroplasten).

Die Untersuchungen mit zum Teil wieder spaltbaren bifunktionalen Reagentien, die als Quervernetzer fungieren (z.B. Dithiobissuccinimidyl-propionat), gestatten, zusätzlich zur Stöchiometrie, eine Aussage über die räumliche Anordnung der einzelnen Proteine im F_1 -Molekül. Aber auch hier zeigt es sich, daß durch die Instabilität einiger ATPasen wie auch durch die Fehler bei der Molekulargewichtsbestimmung Grenzen gesetzt sind: deuteten zunächst Untersuchungen an MF_1 aus Rinderherzen auf das Auftreten von Dimeren der α -Untereinheit, aber keine Reaktion zwischen α und β [Wingfield & Boxer 1975] hin, so konnte später gezeigt werden, daß letztere doch miteinander verknüpft werden können. So gelang es, zusammen

mit einer spezifischen Markierung der β -Untereinheit durch 4-chloro-7-nitro-2-oxa-1,3-diazol (NBD), die Existenz von α - α , β - β , α - β , α - τ , τ - ϵ und δ - ϵ nachzuweisen [Baird & Hammes 1977]. Ähnliche Experimente mit CF_1 zeigten, daß α mit jeder anderen Untereinheit außer sich selbst verknüpft sein kann, β kann ebenfalls mit allen anderen und mit sich selber reagieren und zusätzlich konnten noch Reaktionsprodukte zwischen τ und ϵ nachgewiesen werden [Baird & Hammes 1976]. Im Fall des F_1 aus *E. coli* ergaben die Experimente mit Quervernetzern, daß α und β in alternierender Folge angeordnet sein müssen, τ befindet sich sowohl in der Nachbarschaft von α wie auch von β , während δ nur eine Reaktion mit α zeigt. Die zweite kleine Untereinheit ϵ scheint mehr in der Nähe von τ und einer β -Untereinheit lokalisiert zu sein [Bragg & Hou 1975] (s. Abb. 5). Es ist zu erwähnen, daß bei dem Entwurf dieser Modelle zusätzlich die Funktion der einzelnen Untereinheiten berücksichtigt ist, wie sie weiter unten beschrieben wird.

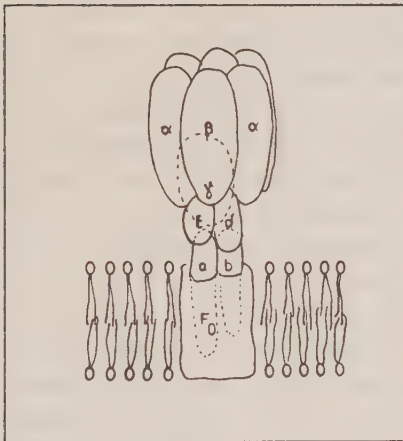


Abb. 5 Modell zur räumlichen Anordnung der F_1 -Untereinheiten in BF_1 [nach Futai & Kanazawa 1983]

Hält man sich die sehr komplexe Struktur der ATP-Synthetase vor Augen, so verwundert es nicht, daß die Untersuchungen zur

Frage nach der katalytischen Funktion des Enzyms trotz einer großen Zahl von Arbeiten noch keine eindeutige Antwort zulassen. Die meisten löslichen ATPasen sind in der Lage, neben ATP andere Purinabkömmlinge und als einziges Pyrimidinderivat UTP mit ähnlicher Geschwindigkeit zu hydrolysieren. Die relative Unempfindlichkeit des Enzyms gegenüber strukturellen Änderungen im ATP- bzw. ADP-Molekül erlaubt es, eine ganze Reihe von Substratanaloga herzustellen und deren Bindung wie auch kinetisches Verhalten zu studieren [Übersicht bei Penefsky 1979, Senior 1979]. Diese Fülle an Daten soll hier nur kurz zusammengefaßt werden.

Es existieren mehrere Bindungsstellen für Nukleotide und deren Analoga im F_1 -Molekül, man kann sie schematisch in zwei Klassen einteilen [Penefsky 1979, Senior & Wise 1983, Amzel & Pedersen 1983]: die erste enthält sogenannte "fest gebundene", nicht austauschbare Substrate; die entsprechenden Dissoziationskonstanten (k_d) sind im allgemeinen kleiner als $1 \mu\text{M}$. Diese Nukleotide sind nicht durch Gelchromatographie, ausgiebige Dialyse, Behandlung mit Aktivkohle oder Ammoniumsulfatfällung abtrennbar [Harris et al. 1973]. Erst durch Chromatographie in 50% Glycerol beispielsweise gelingt es, aktive ATPase darzustellen, die frei von Nukleotiden ist [Garret & Penefsky 1975]. Diese fest gebundenen Nukleotide nehmen nicht am katalytischen Prozeß teil, ihre Funktion wird zum einen in der Regulation [Ohta et al. 1980, Tamura & Wang 1983] oder aber in der Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur des Komplexes gesehen [Senior & Wise 1983].

Die Nukleotide der zweiten Gruppe binden mit einem deutlichen kooperativen Effekt an die ATPase. Während k_d für das erste Molekül im Bereich von 10 bis 100 nM liegt, werden die weiteren mit Konstanten $> 1 \mu\text{M}$ gebunden. Diese Stellen scheinen auf der β -Untereinheit lokalisiert zu sein, sie sind diejenigen, die am katalytischen Prozeß teilnehmen. Die Anzahl der Bindungsstellen insgesamt wird mit sechs angenommen, wobei je drei auf die fest gebundenen bzw. katalytisch wirksamen entfallen [Cross & Nalin 1982].

Es ist sicher nicht ohne weiteres möglich, Mechanismen, die für die lösliche ATPase angenommen werden, auf den gesamten, in der Membran integrierten Komplex zu übertragen. So spielen nicht nur Konformationsänderungen an F_1 in freier Form, sondern auch als membrangebundenes Enzym bei energieabhängigen Reaktionen eine Rolle. An Chloroplasten konnte beispielsweise eine Aufnahme von 50 bis 90 ^3H pro CF_1 gemessen werden, wenn die Organelle, in $^3\text{H}_2\text{O}$ inkubiert, belichtet oder einem pH-Sprung ausgesetzt bzw. ATP zur Hydrolyse zugesetzt wurde [Ryrie & Jagendorf 1972]. Zugabe von Entkopplern oder Inhibitoren der Photophosphorylierung verhindern diesen Einbau. Ein weiterer, direkter chemischer Nachweis wurde durch Einsatz von N-Ethylmaleinimid erbracht [McCartey & Fagan 1973]. Inkubation von Chloroplasten mit diesem Reagens im Dunklen ergab keinen Effekt, nach Belichtung jedoch fand eine Reaktion mit mindestens einer SH-Gruppe in der r-Untereinheit unter gleichzeitiger Inaktivierung des CF_1 statt. Zugabe von ADP und P_a übte einen protektiven Effekt aus.

Bei MF_1F_0 gibt es ebenfalls Hinweise für reaktionsabhängige konformative Änderungen. Die oben beschriebenen "fest gebundenen" Nukleotide können mit deutlich erhöhter Rate ausgetauscht werden, wenn die Membran sich im energetisierten Zustand befindet [Harris & Slater 1975a]. Ähnliche Ergebnisse lassen sich bei Chloroplasten erzielen [Harris & Slater 1975b]. Aurovertin bildet zusammen mit F_1 einen stark fluoreszierenden Komplex. Diese Fluoreszenz kann durch Bindung von ATP vermindert bzw. ADP verstärkt werden [Chang & Penefsky 1973, 1974]. Setzt man die ATP-Synthetase in Mitochondrien mit Aurovertin um, so erhält man nach Zugabe von Succinat eine Fluoreszenzverstärkung, die durch Entkoppler, Ausschluß von O_2 oder Oligomycin wieder aufgehoben werden kann [Chang & Penefsky 1973, Bertina et al. 1973]. Die Änderung der Fluoreszenz wird als Indikator für konformative Änderungen gewertet [Chang & Penefsky 1974]. Eine Reihe weiterer Experimente konnte obige Befunde unterstützen [Übersicht bei Senior 1979].

Auch das Phänomen der Latenz, d.h. Vorliegen von F_1 in einer inaktiven Form, das man bei einigen bakteriellen ATPasen und CF_1 finden kann, wird auf eine definierte Konformation zurückgeführt. Erst die Behandlung mit Hitze [Farron & Racker 1970], reduzierenden Agentien [McCartey & Racker 1968] oder Trypsin [Vambutas & Racker 1965] im Fall des CF_1 oder aber die Reinigung des nativen, inaktiven Enzyms durch hydrophobe Gelchromatographie (*M. lysodeikticus* [Pivel et al. 1980]) ergeben eine Fraktion mit messbarer ATPase-Aktivität. Von einigen Autoren wird die Idee des Polymorphismus stark vertreten [Muñoz 1982]. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Untereinheiten auf der Gelelektrophorese ist sehr stark durch experimentelle Bedingungen bzw. Vorbehandlung von F_1 beeinflussbar. Dazu gehören unter anderem Inkubation mit ATP, Chromatographie an Ionenaustauschern [Adolfson et al. 1975], Alterung bei niedrigen Temperaturen [Nieto et al. 1975], Reinigung durch präparative Gelelektrophorese [Carreira et al., Übersicht bei Muñoz 1982].

Unter bestimmten Präparationsbedingungen (niedriger pH, Vermeiden von chromatographischen Schritten) gelingt es, MF_1 in einer nicht aktiven Form zu gewinnen. Analyse der Zusammensetzung der Untereinheiten ergibt ein sechstes Protein mit Molekulargewichten zwischen 7500 und 10500. Dieses hitzestabile Molekül, das in vielen Organismen (z.B. Hefe [Matsubara et al. 1981], Rinderherz [Pullman & Monroy 1963, Frangione et al. 1981], Rattenleber [Cintrón & Pedersen 1979]) gefunden wurde, ist der physiologische Inhibitor der F_1 -ATPase [Übersicht bei Pedersen et al. 1981]. Die Existenz eines entsprechenden Proteins konnte auch in Chloroplasten nachgewiesen werden [Younis & Morjana 1982a,b]. Der Inhibitor reagiert mit der β -Untereinheit, seine Abtrennung erfolgt durch Hitze, Gelfiltration oder bei erhöhtem pH. Seine Bindung fordert die Gegenwart von Mg^{2+} , ATP und F_1 in aktivierter Form, sie wird bei $pH < 7.0$ beschleunigt, die Dissoziationskonstante k_d liegt in der Größenordnung von 10^{-7} M [Gomez-Fernandez &

Harris 1978, Galante et al. 1981, Schwerzmann et al. 1982, Wong et al. 1982].

Die Funktion und damit auch die Struktur der beiden großen Untereinheiten scheint, ähnlich wie bei dem DCCD-bindenden Protein aus dem F_0 -Teil, bei allen Arten konserviert zu sein. Tab.2 zeigt die Anwesenheit von α und β selbst bei den einfacher gebauten ATPasen. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß die Nomenklatur zunächst durch die Wanderungsgeschwindigkeit bei der Gelelektrophorese definiert ist. So kann auf Grund der sehr ähnlichen Molekulargewichte von α und β bei einigen Organismen die Bezeichnung der beiden vertauscht sein. In den Arbeiten von Walker et al. [1982b] wird auf die ausgeprägte Homologie zwischen den beiden großen Untereinheiten hingewiesen, sie beträgt für die jeweils erste Hälfte der zwei Proteine mehr als 30%. Andere Ergebnisse, wie z.B. die Kreuzreaktion von gegen die gereinigten Untereinheiten hergestellten Antikörpern bei *N. crassa* [Wild, pers. Mitteilung], gaben schon früh einen Hinweis auf diese Verwandtschaft. Dies kann als sicheres Indiz für einen gemeinsamen entwicklungsgeschichtlichen Vorläufer gewertet werden und rechtfertigt die Bezeichnung "Ur-ATPase" im Fall von *Lactobacillus casei* (s.Tab.2).

Die Untereinheit β enthält mit großer Wahrscheinlichkeit das katalytische Zentrum [Penefsky 1979], während die Rolle von α eher in der Regulation der ATP-Hydrolyse bzw. -Synthese gesehen wird [Gresser et al. 1979, Rosen et al. 1979]. Nach Rekonstitutionsexperimenten mit den gereinigten Untereinheiten aus PS3 [Yoshida et al. 1977] und *E. coli* [Futai 1977] bzw. löslichen ATPasen, bei denen δ und ϵ entfernt wurden [Sternweis 1978], ist die τ -Untereinheit an der Organisation der katalytischen Zentren beteiligt. α und β aus *E. coli* oder mitochondrialem F_1 sind erst zusammen mit τ in der Lage, ATP zu hydrolysieren, während bei PS3 dies schon für die Kombination aus β und τ möglich ist [Yoshida et al. 1977a]. Längere Inkubation von CF_1 mit Trypsin ergibt laut Gelelektrophorese einen Verlust von τ , δ und ϵ ohne Verringerung der ATPase

Aktivität [Deters et al. 1975], d.h. α und β allein scheinen bereits einen aktiven Komplex bilden zu können. Analoge Experimente bei *E. coli* ergaben zunächst ein ähnliches Resultat, doch konnte hier mit τ -spezifischen Antikörpern die Existenz eines etwa 10000 D großen Fragments nachgewiesen werden, dessen endgültige Entfernung einen Verlust der Aktivität zur Folge hatte [Smith & Wilkowski 1978]. Die nahe Verwandtschaft, zumindest bei BF_1 , der jeweiligen α , β und τ -Untereinheiten wurde mit Hybridisierungsexperimenten eindrucksvoll unterstrichen [Futai et al. 1980]: man erhält aktive ATPasen, wenn folgende Untereinheiten kombiniert werden:

	<i>E. coli</i>	PS3
1.	α , β	τ
2.	τ	α , β
3.	α , τ	β

Andere Kombinationen waren nicht aktiv. Sehr starke Hinweise bei F_1 aus PS3 und Chloroplasten sprechen für eine zusätzliche Regulationsfunktion der τ -Untereinheit in der Art eines Ventils bei der H^+ -Translokation. Die schon oben erwähnte Reaktion von τ aus CF_1 mit SH-modifizierenden Reagenzien [Weiss & McCartney 1977] hat zusätzlich eine deutliche Steigerung der Protonenpermeabilität der Chloroplastenmembran zur Folge. Die gereinigten Untereinheiten δ und ϵ aus PS3 binden an Vesikel, in die F_0 eingebaut ist, ohne daß dadurch die H^+ -Permeabilität der Membran reduziert wird. Erst die Zugabe von τ ermöglicht es, die Membran abzudichten [Yoshida et al. 1977b]. Dieser direkte Nachweis einer Ventilfunktion gelang bei *E. coli* nicht, aber auch hier sind δ und ϵ für die Bindung aller restlichen Untereinheiten und damit insgesamt für die Abdichtung der Membran unerlässlich [Dunn & Heppel 1981].

	F ₁ E.coli	F ₁ PS3	CF ₁	MF ₁
α	enthält "fest gebundene" Nukleotide, Regulation der enzymatischen Aktivität			
β	enthält "locker gebundene" Nukleotide, Bindung von Aurovertin, katalytisches Zentrum			
γ	bildet zusammen mit α und β aktiven Komplex, Bindung von ϵ	ergibt zusammen mit β aktiven Komplex, bildet mit δ und ϵ H ⁺ -Ventil	Kontrolle der H ⁺ -Translokation, Bindung von ϵ	
δ	ellipsoide Form, α -Helix Gehalt von mehr als 50%, Bindung an α , ermöglicht Membranbindung	Bindung von F ₁ an F ₀ , Ventilfunktion mit δ und γ	ellipsoide Form, Bindung von F ₁ an F ₀	
ϵ	nonkompetitiver Inhibitor der löslichen ATPase	bildet mit α und β aktiven Komplex	hydrophobes Protein, nichtkompetitiver Inhibitor der F ₁ -ATPase	

Tab.3 Funktion der F₁-Untereinheiten in *E.coli*, PS3, Chloroplasten und Mitochondrien

Für MF₁ ist es erwiesen, daß die Rekonstitution des gesamten ATPase Komplexes nicht durch die F₁-Untereinheiten allein bewerkstelligt werden kann, vielmehr sind hier zwei weitere Proteine erforderlich. Das erste stellt, neben der Bindung an F₀, die Empfindlichkeit für Oligomycin wieder her, es wird als OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein) bezeichnet [MacLennan & Tzagoloff 1968]. Es ist in der Größe mit den δ -Untereinheiten aus Bakterien und Chloroplasten vergleichbar, durch Sequenzanalyse einiger Fragmente des OSCP aus Rinderherzmitochondrien konnte eine direkte Verwandtschaft zu δ aus *E. coli* bewiesen werden [Walker et al. 1982a]. Unter-

stützt wird die Rekonstitution durch ein weiteres Protein, das mit F_6 bezeichnet wird (Molekulargewicht ca. 8000) [Knowles et al. 1971]. Inwieweit diesen beiden entsprechende Untereinheiten aus BF_1 und CF_1 zuzuordnen sind oder ob sie ihre Analoga im F_0 -Teil haben, müssen weitere Untersuchungen zeigen. ϵ besitzt in vielen bakteriellen ATPasen und in Chloroplasten inhibitorische Aktivität [Sternweis & Smith 1980, Nelson et al. 1972, Baird & Hammes 1976]. Diese ist aber nur an freiem F_1 und zum Teil in mehr als stöchiometrisch erforderlichen Mengen messbar, die physiologische Bedeutung ist daher umstritten. Tab.3 gibt noch einmal stichwortartig einen Überblick über die Funktionen der einzelnen Untereinheiten in den verschiedenen Organismen.

1.3. Hypothesen zum Mechanismus der ATP-Synthese

Die ursprünglich von Mitchell [1976] vertretene Annahme, daß für die Synthese von ATP ein direkter Transport von H^+ an die katalytisch wirksame Region der F_1 -ATPase stattfindet, kann heute nicht mehr aufrecht gehalten werden. Im Vergleich zu anderen ATPasen, die Kationen transportieren, kann bei der ATP-Synthetase ein phosphoryliertes Intermediat mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Setzt man Substrat ein, dessen γ -Phosphatgruppe stereospezifisch mit Sauerstoff markiert ist, so kann man Inversion während der Reaktion feststellen, was auf einen Reaktionsmechanismus mit einem oder zumindest einer ungeraden Anzahl von Schritten schließen läßt [Webb et al. 1980].

Die erhaltenen Befunde stützen inzwischen mehr den von Boyer [1973] vorgeschlagenen Mechanismus. Dabei finden im einzelnen folgende Prozesse statt [Rosen et al. 1979, Cross 1981, Boyer et al. 1982, Gresser et al. 1982, Nalin & Cross 1982, Kohlbrenner & Boyer 1983, O'Neal & Boyer 1984]:

1. Die β - γ Bindung im ATP kann sowohl im membrangebundenen wie auch im freien F_1 reversibel und ohne Energiebedarf gespalten werden.
2. Wird dem System Energie (durch den H^+ -Gradienten oder Hydrolyse von ATP) zugeführt, ändern sich die Affinitäten der Substratbindungsstellen so, daß ADP und P_a aufgenommen und ATP abgegeben werden kann, dabei wird der Gesamtbetrag an Energie wahrscheinlich ausschließlich für Konformationsänderungen eingesetzt.
3. Die katalytischen Zentren ($3/F_1$) zeigen einen kooperativen Effekt. Eine der zunächst gleichwertigen Bindungsstellen enthält damit

stets fest gebundenes ATP im Gleichgewicht mit $\text{ADP} + \text{P}_a$, während die anderen beiden Stellen mit eher locker gebundenen Nukleotiden besetzt sind.

Für den Ablauf der Gesamtreaktion müssen mindestens zwei Konformationen für die ATPase diskutiert werden:

- E_1 : an Enzym gebundenes ATP, ADP und P_a stehen jeweils im Gleichgewicht mit dem Medium und
- E_2 : gebundenes ATP steht im Gleichgewicht mit gebundenem ADP und P_a [Boyer et al. 1982, Hatefi et al. 1982, Hammes 1982]

Die Aufschlüsselung der einzelnen Reaktionsschritte ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Hier hat es sich als wertvoll erwiesen, bei *E.coli* eine ganze Reihe von Mutanten im Bereich des *unc*-Operon zur Verfügung zu haben [Übersicht bei Senior & Wise 1983], an denen das Zusammenwirken der Untereinheiten noch detaillierter untersucht werden kann.

1.4. Biogenese der H^+ -ATPase

Die genetische Organisation des BF_1F_0 -Komplexes im *unc*- oder *atp*-operon [Gibson et al. 1978, Downie et al. 1981] ist bei *E. coli* recht gut untersucht. So enthält das Operon 9 Gene, dessen erstes, *uncI*, die Information für ein mögliches viertes Protein des Membransektors tragen könnte (s. auch Abschnitt 1.2.1) [Gay & Walker 1981b]. Daran anschließend folgen die Strukturgene für die bekannten Untereinheiten des F_0 -Teils in der Reihenfolge *uncB*, *-E* und *-F*, die α , c und b entsprechen. Die Gene der Proteine aus F_1 schließen daran an mit *uncH* (δ), *uncA* (α), *uncG* (τ), *uncD* (β) und *uncC* (ϵ). Eingerahmt werden diese Gene von einer Promoter-Sequenz vor *uncI* und einer Region hinter *uncC*, die einer Terminator-Sequenz entspricht [Kanazawa et al. 1982a, Saraste et al. 1981, Gay & Walker 1981b].

Bei den Eukaryonten dagegen ist die Situation weniger übersichtlich. Die H^+ -ATPasen der Mitochondrien und der Chloroplasten sind in genetischer Hinsicht Chimären, d.h. ein Teil ihrer Untereinheiten ist nukleär codiert, für die anderen befindet sich die genetische Information in der Organellendns (s.Tab.4). Neben der Frage der genetischen Organisation dieser Bezirke und der entsprechenden Synchronisation während der Synthese stellt sich hier natürlich auch das Problem des Transports der cytosolisch synthetisierten Proteine bis an ihre Wirkungsstätte. So weiß man, daß die bis heute bekannten cytosolisch synthetisierten mitochondrialen Proteine in Form von wasserlöslichen Vorstufen an freien cytoplasmatischen Ribosomen hergestellt werden [Neupert & Schatz 1981]. In vielen Fällen besitzen sie eine N-terminale Verlängerung, die im maturen Protein fehlt [Teintze & Neupert 1982]. Der Transport in oder durch die Mitochondrienmembranen erfolgt im Falle der F_1F_0 -Untereinheiten über zwei Schritte [Schmidt et al. 1984]:

	F ₁							F ₀		
	α	β	τ	δ	ε			I	II	III
Chloro- plasten	O	O	C	C	O			O	C	O
Mito- chondrien						F ₀	OSCP	6	3	9
<i>S.cerevis.</i>						C	C	C	C	C
<i>N.crassa</i>	C	C	C	C	C			O	O	C
Rind	C	C	C	C	C	C	C	O	O	C

Tab.4 Lokalisation der jeweiligen Gene für die Synthese der Untereinheiten der H⁺-ATPasen
C: Cytosol, O: Organelle; Untereinheit III bzw. 9 entspricht dem sogenannten Proteolipid

- erkennen und binden der Vorstufe an einen mitochondrialen Rezeptor,
- eine limitierte Proteolyse, durch die das prozessierte Protein die Membran durchdringen kann.

Dabei sind die Erkennungsmerkmale für den Rezeptor in der Präsequenz lokalisiert; so war es möglich, cytosolische Proteine nach synthetischer N-terminaler Verlängerung mit entsprechenden Präsequenzen in das Mitochondrium zu schleusen [Hurt et al. 1984, 1985]. Untersuchungen zu den prozessierenden Aktivitäten haben gezeigt, daß diese im Matrixraum lokalisiert sind und möglicherweise jeweils spezifisch für eine ganze Gruppe von Vorstufen sind [Schmidt et al. 1984]. Die Charakterisierung dieser Proteasen erfordert Kenntnisse über die Primärstruktur sowohl der nicht-prozessierten wie auch der maturen Proteine.

1.5. Plan

Ziel dieser Arbeit war es, die Primärstruktur der kleinen Untereinheit δ aus F_1 aus *Neurospora crassa* aufzuklären. Damit sollte die vollständige Sequenz dieser Untereinheit aus einer mitochondrialen ATPase erstellt werden, um für diesen Fall weitere Untersuchungen zur Bindung von F_0 an F_1 mit wieder spaltbaren Quervernetzern durchführen zu können. Zusätzlich könnte mit der bekannten Sequenz ein weiteres Beispiel für die Prozessierung und Einschleusung eines nukleär codierten Produkts in Mitochondrien studiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Serva, Heidelberg:

CPG-10-75 A (controlled-pore glass, 200-400 mesh)

Dodecylsulfat-Na-Salz, reinst

Acrylamid, p.A.

N,N'-Methylenbisacrylamid, reinst

Ammoniumperoxodisulfat, p.A.

N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, reinst

Coomassie Brillant Blau

o-Tolidin p.A.

Guanidin-hydrochlorid, p.A.

Ethylendiamintetraacetat-Na₂-Salz, p.A.

CNBr, reinst

5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonylchlorid, p.A.

Trimethylchlorsilan, reinst

Dithioerythrit, reinst

Harnstoff, p.A.

Fluorescamin, p.A.

PTH-Chrom S

Albumin (Rinderserum), Cytochrom c (Pferdeherz), Myoglobin
(Pottwal)

Fluka, Buchs:

Triethylamin, puriss. p.A.

Dimethylformamid, für UV-Spektr.

N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid,
puriss.biochim.

1-Hydroxybenzotriazol, purum

Phenylisothiocyanat, puriss. p.A.

4-Dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat

Andere:

Citraconsäureanhydrid, p-Phenylendiisothiocyanat: Eastman,
Kodak, Rochester N.Y.

DC-Fertigfolien F 1700 Mikropolyamid: Schleicher & Schüll,
Dassel

N-Bromsuccinimid: Roth, Karlsruhe

Polyacrylamid-Gele (Biogel[®]): Biorad Laboratories, Richmond
Ca.

Dextran-Gele (Sephadex[®], Sephacryl[®]): Pharmacia fine
Chemicals, Uppsala, Schweden

DEAE-Cellulose: Whatman, Maidstone, England

Alle weiteren Chemikalien wurden in höchst möglicher Reinheit
von Merck, Darmstadt bezogen.

2.2. Methoden

2.2.1. Analytische Methoden

2.2.1.1. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Die Gelelektrophoresen wurden im Prinzip nach den Methoden von Weber und Osborne [1969] bzw. Swank und Munkres [1971] durchgeführt. Als Puffer wurden 0.1 M Tris, 0.5% NaDodSO₄, pH 8.0 bzw. die gleiche Zusammensetzung in 6 M Harnstoff eingesetzt. Abhängig von der Fragestellung wurde die Konzentration an Acrylamid zwischen 10 und 15% variiert mit einem Verhältnis von 1:10 bis 1:30 Bisacrylamid zu Acrylamid.

Die Herstellung der Gele erfolgte nach Einwaage der oben angegebenen Menge zusammen mit 0.05% (NH₄)₂S₂O₈. Etwaige Verunreinigungen wurden durch Filtration entfernt; unmittelbar vor dem Gießen wurde dem Polymerisationsgemisch 1 µl/ml TMEDA als Starter hinzugefügt. Als Gießschablonen wurden von der hauseigenen Werkstatt hergestellte Kunststoffformen (130 x 200 x 3 mm) mit vorgeformten Auftragspalten (Volumen etwa 20 µl, für horizontale Elektrophorese) verwendet, anschließend wurden die Gele für mindestens 24 h im jeweiligen Puffer aufbewahrt.

Die Lösung der Proteinproben erfolgte im oben beschriebenen Puffer mit Zugabe von NaDodSO₄ auf 2% Endkonzentration. Aufgetragen wurden 20 µl (ca. 20-40 µg Protein); nachdem das Protein bei 30 mA/Gel eingewandert war, wurden die Gele mit einem Kühlsystem abgedeckt und die Elektrophorese bei 60 mA/Gel weitergeführt, bis als Standard zugegebenes Cytochrom c (Pferdeherz) etwa 7 cm weit gewandert war.

Die Färbung der getrennten Proteine wurde für mindestens 3 h mit Coomassie Brilliant Blau in MeOH/H₂O/AcOH (5:5:1 v/v/v)

durchgeführt, anschließend die Gele in dem reinen Lösungsmittel entfärbt und in 10% AcOH aufbewahrt.

Als Alternative wurde eine kleine vertikale Elektrophoreseeinheit eingesetzt (Geschenk J.E.Walker, Cambridge). Hier betrug die Größe der Gießschablone 40 x 90 x 2 mm, mit einer entsprechenden Form konnten Auftragsspalte für 10 Proben a 20 μ l hergestellt werden. Die Proben wurden zum Auftragen mit Glycerol versetzt, nach dem Einwandern (10 mA) wurde die Elektrophorese bei 20-30 mA durchgeführt. Färben und Entfärben erfolgte wie beschrieben, aber bei erhöhter Temperatur (56°C); insgesamt war es so möglich, nach etwa 3 h bereits eine erste Aussage zu treffen.

2.2.1.2. Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. [1951], die Proteinproben wurden entweder in 2% NaDodSO₄ oder 80% FoOH (und anschließender Neutralisation mit 5 N NaOH) gelöst. Als Standard diente Albumin aus Rinderserum.

2.2.1.3. Dünnschichtchromatographie

Proteinhaltige Proben (0.1-1 nmol) wurden auf DC-Platten (DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 oder FPTLC-Platten, beide Merck) aufgetragen (5-20 μ l) und in den jeweils angegebenen Fließmitteln entwickelt, anschließend wurden die Platten im Trockenofen (ca.100°C) getrocknet. Die Detektion der Peptide erfolgte zuerst mit Fluorescamin (0.003% in Aceton), das mit einem Pinsel aufgetragen wurde. Nach Reaktion mit primären Aminogruppen können die Platten unter UV-Licht (350 nm) betrachtet werden. Als weitere Färbemethode wurde das Chlor/o-Tolidin-Reagens [Reindl & Hoppe 1954] eingesetzt. Hierzu wird die getrocknete DC-Platte zunächst für 5 min

einer Cl_2 -Atmosphäre ausgesetzt, dann überschüssiges Chlorgas mit einem Fön entfernt und die Peptide durch Ansprühen mit einer o-Tolidin Lösung (1 l 0.05 M KJ, 3 g o-Tolidin, 20 ml AcOH, mit H_2O auf 2 l aufgefüllt) angefärbt.

2.2.1.4. Aminosäureanalysen

Entsprechende Aliquots wurden in kleinen Glasröhrchen eingetrocknet, mit 100 μl 5.7 N HCl versetzt und dann unter Wasserstrahlvakuum zugeschmolzen. Die Dauer der Hydrolyse betrug im allgemeinen 1 h bei 160°C , der Nachweis der Aminosäuren erfolgte an einem Analysator (Durrum, Palo Alto, Ca).

2.2.1.5. Bestimmung des N-Terminus mit Dansylchlorid [Gray 1972]

0.2-1 nmol Peptid wurden in Glasröhrchen eingetrocknet. Der Rückstand wurde in 10 μl 0.2 M NaHCO_3 aufgenommen und mit 10 μl Dansylchloridlösung (10 mM in Aceton) für 15 min bei 56°C zur Reaktion gebracht. Nach erneutem Eintrocknen erfolgte die Hydrolyse mit 5.7 N HCl unter Vakuum für 30 min bei 160°C . Das eingetrocknete Hydrolysat wurde zur Identifizierung in 95% EtOH aufgenommen und 1-3 μl auf beidseitig beschichteten DC-Folien (2 cm x 2 cm) aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte der Reihe nach in folgenden Laufmitteln:

I. 1.5% FoOH, dann senkrecht dazu

II. Benzol/AcOH 10:1 v/v

III. Essigsäureethylester/MeOH/AcOH 20:1:1 v/v/v

Zur Bestimmung der Derivate von Arg und His wurde als viertes Laufmittel 1.5% NH_3 verwendet (Laufrichtung wie I.). Die Identifizierung erfolgte im UV-Licht (254 oder 350 nm) anhand

eines auf der Rückseite gleichzeitig chromatographierten Standardgemisches.

2.2.1.6. Bestimmung der N-terminalen Sequenz mit der Methode nach Chang [Chang et al. 1978]

Es wurde zunächst von einer Stammlösung von DABITC in Aceton (6 mg/2 ml) Portionen zu je 100 µl in 1.5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt und eingetrocknet. Unmittelbar vor Verwendung wurden 100 µl Pyridin zur Lösung zugegeben und in 50 µl-Portionen eingesetzt. Für die Reaktion wurden 2-10 nmol Peptid in 100 µl 50% Pyridin (v/v) gelöst und mit der oben beschriebenen frisch bereiteten DABITC-Lösung unter N₂ für 60 min bei 56°C gehalten. Anschließend wurden unter N₂ 10 µl PITC zugegeben und für weitere 30 min bei 56°C belassen. Nach der Kopplungsreaktion wurden Reagentien und Nebenprodukte mit zwei bis drei Portionen Heptan/Essigsäureethylester 2:1 (v/v) extrahiert und die wäßrige Phase eingetrocknet. Zum gut getrockneten Rückstand wurden 100 µl TFA gegeben, mit N₂ begast und für 30 min bei 56°C zur Reaktion gebracht. Nach erneutem Eintrocknen erfolgte die Extraktion von DABTZ- und PTZ-Aminosäuren mit 50 µl Wasser und 200 µl Essigsäurebutylester. Beide Phasen wurden eingetrocknet, der Rückstand aus dem wäßrigen Anteil wurde einem neuen Zyklus zugeführt, während der organische Extrakt in 50 µl AcOH und 20 µl 4 N HCl für 60 min bei 56°C konvertiert wurde. Zum Nachweis wurden die DABTH-Derivate in 90% Ethanol gelöst und auf DC-Folien aufgetragen (2 cm x 2 cm). Als Laufmittel wurde für die erste Richtung 10% FoOH/Ethanol 10:9 (v/v) und senkrecht dazu AcOH/Toluol/n-Hexan 1:2:1 (v/v/v) gewählt [Yang 1979]. Nach Trocknen der Folien wurden die DABTH-Derivate mit HCl-Gas sichtbar gemacht und analysiert.

2.2.2. Modifizierung und Spaltung von Peptiden

2.2.2.1. Umsetzung von Aminogruppen mit Citraconsäureanhydrid [Dixon & Perham 1968]

300-500 nmol Peptid wurden in 200-400 μ l Pyridin/ H_2O gelöst und mit 0.1 M $Na_4P_2O_7$ auf 1 ml aufgefüllt. Die Umsetzung wurde mit einem hohen molaren Überschuß an Citraconsäureanhydrid (500:1, bezogen auf NH_2 -Gruppen) in Dioxan als Lösungsvermittler (1:1 v/v) durchgeführt. Dabei wurde mit 5 N NaOH der pH zwischen 8.1 und 8.5 gehalten. Der gesamte Ansatz wurde dann auf einer Säule mit Sephadex G 15 f in 0.1 M NH_4HCO_3 , pH 8.6 entsalzt.

2.2.2.2. Reduktion von Methioninsulfoxid

Zur Reduktion mit $NaBH_4$ wurde das Protein (200-400 nmol) in 1 ml 50% Ethanol suspendiert und für 6 h mit einer Spatelspitze des Reagens bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

Eine Lösung des Peptids (300 nmol) in 1 ml Pyridin/ H_2O 1:1 (v/v) wurde unter Begasung mit N_2 über Nacht mit 100 μ l (t-Bu) $_3$ P in 100 μ l PROH umgesetzt [Rüegg & Rudinger 1977]. Nach Ablauf der Reaktion wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer eingengt.

Nach Lösen des Peptids (bis zu 500 nmol) in 1-2 ml 80% FOOH wurden 100-200 μ l Mercaptoethanol zugesetzt [Savige & Fontana 1977]. Die Reaktion erfolgte für 3-6 h bei Raumtemperatur, anschließend wurde zuerst im Wasserstrahl-, dann im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt. Als Alternative wurde nach

dem Trocknen im Wasserstrahlvakuum überschüssiges Mercaptoethanol mit MeOH oder EtOH extrahiert.

2.2.2.3. Spaltung mit CNBr [Gross & Witkop 1961]

Das Peptid wurde in 80% oder konzentrierter FoOH gelöst (1-2 ml) und mit einem 100fachen molaren Überschuß an CNBr für 18-24 h bei Raumtemperatur im Dunklen gehalten. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingetrocknet, nochmal in 80% FoOH gelöst und wieder eingetrocknet.

2.2.2.4. Spaltung nach Tyrosin [Ramachandran & Witkop 1967]

400-500 nmol des zu spaltenden Peptids wurden in konzentrierter oder 80% FoOH (1-2 ml) gelöst und mit einem 100fachen Überschuß von NBS oder oJBA bezogen auf Tyr für 3 h bei Raumtemperatur oder 37°C umgesetzt. Nach Abzug des Lösungsmittels wurde der Rest in einem kleinen Volumen FoOH gelöst und direkt zur Gelchromatographie eingesetzt.

2.2.2.5. Spaltung mit Trypsin

Zur tryptischen Spaltung wurden die Peptide in 50% Pyridin oder 0.1 M NH_4HCO_3 gelöst und mit zwei Portionen Trypsin (Merck TPCK-behandelt, je 1:100 M/M Trypsin/Protein) im Abstand von 30 min bei 37°C umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von konzentrierter AcOH oder FoOH gestoppt, der Ansatz eingeeengt und im entsprechenden Puffer gelöst zur Gelchromatographie eingesetzt.

2.2.3. Reinigung von Proteinen und Peptiden mit säulenchromatographischen Methoden

2.2.3.1. Gelfiltration

Angaben über Gelmatrices, Säulendimensionen, Elutionsmittel und Flußraten sind in den Legenden der Abbildungen zu finden. Mit Ausnahme der großlumigen Säulen (Durchmesser 3cm und mehr), deren Eluate über eine Uvicord-Einheit (LKB, Schweden) bei 278 nm detektiert wurden, wurden alle anderen mit einem chromatographischen System betrieben, das sowohl für analytische (z.B. 5 nmol eines Dipeptids) wie auch präparative (z.B. 10 μ mol) Trennungen geeignet war [Rückel 1980]. Eine kontinuierliche Flußrate (auch bei z.B. 50 μ l/h) wurde durch Spritzenpumpen ermöglicht, deren Fördermenge über einen weiten Bereich in kleinen Stufen einstellbar war. Als elegante Alternative kamen speziell für die konzentrierten organischen Säuren stufenlos regulierbare Tandempumpen hinzu, bei denen über Ventile gesteuert ein Kolben förderte, während der andere gleichzeitig gefüllt wurde; am jeweiligen Umkehrpunkt erfolgte dann eine Umschaltung.

Die Chromatographiesäulen mit Längen von 150 cm (nur in Ausnahmefällen länger) und Innendurchmesser von 0.3 bis 1.0 cm waren aus Duranglas gefertigt und am unteren Ende mit Glasfritten (D2) versehen. Die Verbindungen bestanden aus Teflon- oder Polyethylenschläuchen mit einem Innendurchmesser von 0.6 mm. Die Säulen wurden mit Flußraten zwischen 3.5 und 4.5 cm/h betrieben.

Die Detektion des Eluats erfolgte bei 280 nm in Photometern (Eppendorf, Shimadzu), die beide mit einer 6fach Wechselküvetten-Einrichtung ausgerüstet waren. So konnten pro Photometer 6 Säuleneluate gleichzeitig mit Mehrkanalpunktdruckern (Philips, Kassel) registriert werden. Das Volumen der Küvet-

ten betrug bei einem Lichtweg von 1 cm und einer Bohrung von 0.1 cm Durchmesser ca. 8 μ l.

Zur Detektion von Peptiden, die keine aromatischen Aminosäuren enthalten, wie auch für die Chromatographie in stark absorbierenden Puffern (z.B. Pyridin) kamen (in Reihe mit dem Photometer) Differentialrefraktometer (Knauer, Waters) zum Einsatz, die soweit modifiziert wurden, daß sämtliche korrodierbaren zu- und abführenden Edelstahlkapillaren (Lötstellen) gegen Teflonschläuche ausgetauscht wurden. Die Vergleichsküvette wurde hier jeweils mit dem zum Säulenkopf führenden reinen Elutionsmittel durchspült.

2.2.3.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographien wurden an einem Gerät der Firma Spectra Physics (SP 8000 B) durchgeführt. Bei diesem Gerät ist es möglich, drei mobile Phasen vor der Säule zu beliebigen Gradienten zu mischen (konkav, konvex, linear). Als Säulen kamen sogenannte "reversed phase" (Serva RP8, RP18 je 5 μ) zum Einsatz, die mobilen Phasen werden im Ergebnisteil (3.2.2.) besprochen. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 210 nm, für die PTHs wurde eine Wellenlänge von 268 nm gewählt (Detektor SP 8400). Die Säulentemperatur wurde im allgemeinen bei 50°C in einem Wasserbad konstant gehalten. Für die PTHs stand ein automatischer Probenaufgeber (WISP 720B, Waters) zur Verfügung.

2.2.4. Bestimmung der Primärstruktur mit dem Festphasen-Sequenator

2.2.4.1. Kopplung der Peptide an den festen Träger

2.2.4.1.1. Lactonkopplung [Horn & Laursen 1973, Wachter & Werhahn 1980]

20-100 nmol Peptid wurden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß in 500 µl wasserfreier TFA aufgenommen und in einem beheizten Exsiccator (56°C, 10 min) eingetrocknet. Nach Lösen der Lactonform in 200 µl DMF und Zugabe von 100 bzw. 200 mg APG sowie 10 µl TEA wurde die Kopplung für 2 h bei 56°C durchgeführt. Der beladene Träger wurde dann in ein Frittchen gespült (D1, Filternutsche 2 ml), mit 2 x 1 ml TFA und anschließend 2 x 1 ml MeOH gewaschen. Nach Verschließen der Fritte mit einem Gummistöpsel wurde das Glas im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

2.2.4.1.2. DITC-Kopplung [Laursen et al. 1972]

20-100 nmol Peptid wurden wie bei der Homoserinlactonkopplung (2.2.4.1.1.) in TFA getrocknet und anschließend in DMF gelöst. Nach Zugabe von DITC-Glas und 10 µl TEA wurde die Kopplung für 2 h bei 56°C durchgeführt. Waschen und Trocknen des beladenen Trägers erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.4.1.3. C-terminale Kopplung [Previero et al. 1973]

Vorbehandlung und Mengen der Peptide wie auch Waschen und Trocknen des beladenen Glases waren wie bei den vorhergehen-

den Kopplungsmethoden. Nach Lösen in DMF erfolgte die Aktivierung der COOH-Gruppen mit HOBT und EDC, die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur fortgeführt.

2.2.4.2. Sequentieller Abbau der Peptide nach Edman [Edman 1950]

Der technische Stand des Sequenzers sowie die Cyclen und eingesetzten Puffer sind in [Wachter & Werhahn 1979] beschrieben und wurden im Verlauf der Arbeit nicht geändert.

2.2.4.3. Detektion der PTHs

Vor der Identifizierung mußten die aus dem Sequenator erhaltenen Thiazolinonderivate in die stabileren Thiohydantoine überführt werden. Dazu wurden die Proben in einem heizbaren Exsiccator bei 56°C eingetrocknet und anschließend in einem Exsiccator bei 80°C mit methanolischer HCl konvertiert. Nach Zugabe einer entsprechenden Menge MeOH und eines internen Standards (PTHs von α -Aminobuttersäure, Nle oder α -Aminoheptansäure) wurden die Proben identifiziert.

2.2.4.3.1. Gaschromatographische Identifizierung

Die Bestimmung der PTH-Derivate erfolgte an einem Gaschromatographen mit schwefelspezifischem, flammenphotometrischen Detektor (Shimadzu-GC 6A, FPD). Die Trennung erfolgte isotherm auf einer Kieselgurphase (PTH-Chrom-S, 0.75% SE 30-4.25% QF 1 auf Chromosorb auf WAW HMDS, Serva); bei 210°C die PTHs von Ser, Ala, Val, Gly, Thr, Ile, Pro und Leu; bei 250°C die Methyl ester von Asp und Glu sowie Met und Phe.

2.2.4.3.2. Identifizierung mit dem Massenspektrometer

Für den Nachweis mit dem Massenspektrometer (Finnigan 3200, elektrische Ionisation, multiple ion detection) wurden 1 - 5 µl des gelösten PTH in ein spezielles Mikrogefäß eingefüllt und getrocknet. Der Nachweis der ionisierten und z.T. fragmentierten Aminosäurederivate erfolgte hier rechnergesteuert, so wurden in 32 frei wählbaren Kanälen über einen definierten Zeitraum die Signale der Fragmente akkumuliert und davon der Untergrund subtrahiert. Die Nachweisgrenze lag hier, ähnlich wie bei der Gaschromatographie, bei ca. 5 pMol.

2.2.4.3.3. Identifizierung durch HPLC

Die Trennung und Detektion der PTHs erfolgte an dem oben genannten Gerät, weitere Details werden in 3.2.1. beschrieben.

2.2.5. Präparation von F_1 -ATPase

2.2.5.1. Züchtung von *Neurospora crassa*-Hyphen (Wildtyp 74A)

Die Züchtung erfolgte in Vogels Minimalmedium (2% Saccharose) bei 25°C unter steriler Belüftung [Vogel 1956]. Die Inokulation fand mit 2×10^6 Konidien/ml statt; gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase (nach ca. 15-18 h) wurden die Hyphen geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -18°C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug etwa 10 g Hyphen/l Kulturmedium.

2.2.5.2. Präparation von Mitochondrien [Sebald et al. 1979c]

Gefrorene Hyphen (ca. 3 kg) wurden manuell zerkleinert und in Portionen zu je 170 g in einem 6-fachen Volumen Aufschluß-Medium (0.33 M Sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5, Medium I) aufgeschwemmt (Endvolumen 1 l). Nach Zugabe von PMSF (0.5 mM) wurde in einem Küchenmixer für 1 min homogenisiert, wobei der pH mit 2 M Trisbase zwischen 7.5 und 7.8 gehalten wurde. Die Lyse der Zellen fand anschließend in einer von Weiss et al. [1970] beschriebenen Mühle statt. Nach einer ersten Zentrifugation für 3 min bei 2000 g werden die Mitochondrien im Überstand erhalten, diese werden anschließend bei 13000 g für 60 min sedimentiert. Erneutes Suspendieren im Medium I und Zentrifugation bei zuerst 5 min 4000 g und des Überstands bei 27000 g für 15 min ergibt eine Mitochondrienfraktion, die bis zur weiteren Verarbeitung bei -15°C aufbewahrt wurde. Alle Arbeiten wurden bei 0-4°C durchgeführt.

2.2.5.3. Präparation von F_1 -ATPase

Die gefrorenen Mitochondrien wurden in einem hypotonen Isolations-Medium (30 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM ATP, pH 7.5, Medium II) resuspendiert (30 min bei 0°C) und für 15 min bei 27000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände erfolgte erneute Suspension der Membranen im gleichen Puffer mit anschließendem Ausschütteln (1:1) mit CHCl_3 bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation (15 min 27000 g) erhält man eine Trennung in zwei Phasen mit einem Niederschlag im Zwischenphasenbereich. Die wäßrigen Überstände wurden vereinigt und auf eine Säule mit DEAE-Cellulose (DE 52, Whatman, 20g/500 mg Protein, mit Medium II äquilibriert) aufgetragen. Die Elution erfolgte zunächst mit 300 ml reinem Puffer, dann stufenweise mit 30 mM KCl und zur Elution von F_1 mit 300 mM KCl. Anschließend wurde das Protein mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g/ml) gefällt. Nach Zentrifugation des Niederschlags (10 min 40000 g) wurde dieser in einem geringen Volumen Medium aufgenommen und auf eine Säule (Biogel A-0.5 m, 100-200 mesh, 3 x 150 cm, hypotones Isolations-Medium, 25 ml/h) aufgetragen. Der Auslauf wurde bei 280 nm gemessen und der erste nach dem vorderen Ausschlußvolumen auftretende Gipfel gesammelt. Die so gereinigte F_1 -ATPase wurde wiederum mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt und als Niederschlag bei -18°C aufbewahrt.

3. Ergebnisse und Diskussion

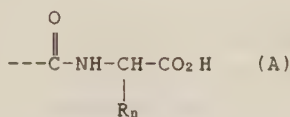
3.1. Allgemeines zur Sequenzierung

Da ein Schwerpunkt dieser Arbeit die Sequenzierung von Proteinen bildet und einige der angewendeten Methoden sich während dieser Zeit änderten, soll hier zunächst ein kurzer Überblick gegeben werden.

Der erste Schritt bei der Sequenzierung mit der Festphasenmethode ist die kovalente Kopplung des zu untersuchenden Peptids an einen festen Träger [Übersicht bei Laursen & Machleidt 1980]. Von den in der Literatur angegebenen Materialien wird in unserem Labor ausschließlich poröses Glas eingesetzt [Haller 1965]. Nach entsprechender Behandlung enthält dieses auf seiner Oberfläche kovalent gebundene Aminopropylgruppen, die für eine Kopplungsreaktion zur Verfügung stehen [Wachter et al. 1973]. Die Bindungspartner auf Seiten des Peptids stellen in der Hauptsache zwei funktionelle Gruppen:

1. Aminogruppen (Lys-Seitenketten, Amino-ethyl-Cys, Ornithin, N-terminale Aminogruppe)
2. Carboxylgruppen (Glu-, Asp-, Carboxy-methyl-Cys Seitenketten und C-terminale Carboxylgruppe)

Im Prinzip stehen natürlich noch andere Reaktionszentren zur Auswahl, beispielsweise die Thiolgruppe der Cys-Seitenreste [Chang et al. 1977b] oder auch die aromatische Gruppen (His, Tyr) [Chang et al. 1977c], doch sind bei diesen die Kopplungsausbeuten bei der Trägerfixierung im allgemeinen geringer.



a) Carbonyldiimidazol
[Laursen 1971]



b) Trifluoressigsäureanhydrid
[Lee & Riordan 1978]



c) Carbodiimid + HOBT
[Laursen & Machleidt 1980]

d) Carbodiimid
[Schellenberger et al. 1972, Mech et al. 1976]

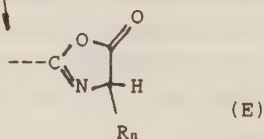
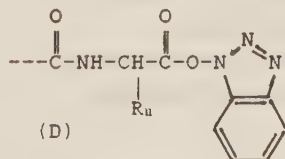
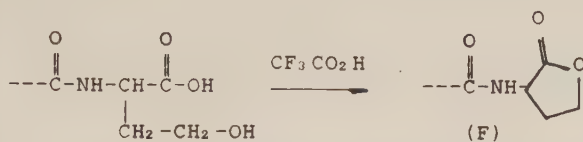
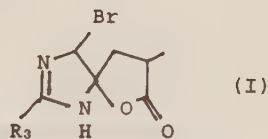
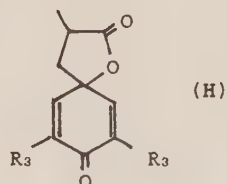
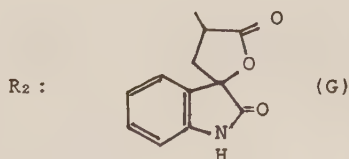
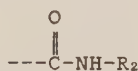
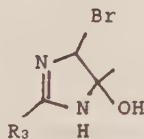
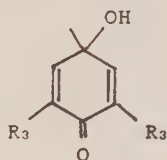
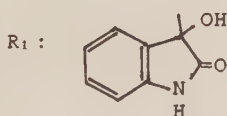
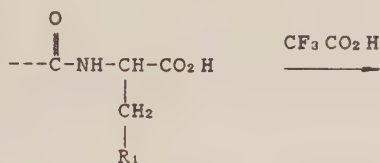


Abb.6 Methoden der Peptidkopplung an einen festen Träger über Carboxylgruppen



e) Homoserinlacton [Horn & Laursen 1973]



f) Spironolacton [Wachter & Werhahn 1979, 1980]

Abb.6 (Forts.) Methoden der Peptidkopplung an einen festen Träger über Carboxylgruppen

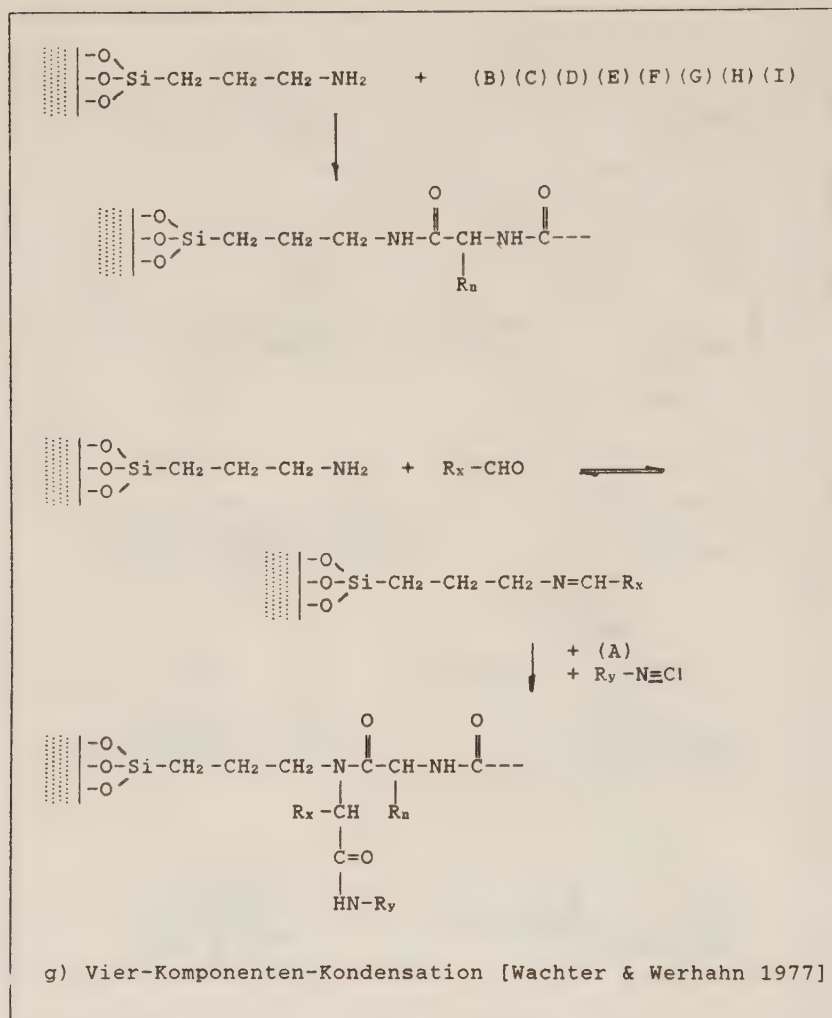


Abb.6 (Forts.) Methoden der Peptidkopplung an einen festen Träger über Carboxylgruppen

Die Fixierung eines Proteins über seine Carboxylfunktionen erfordert zunächst deren Aktivierung. Eine Auswahl der verschiedenen Möglichkeiten ist in Abb.6 gezeigt. Eine Besonder-

heit stellen die Beispiele e und f dar; hier hat man die Möglichkeit, die nach chemischer Proteinspaltung entstandenen C-terminalen Aminosäuren durch Wasser abspaltende Reagenzien in die jeweiligen Lactonderivate zu überführen, deren Reaktivität groß genug ist, um direkt mit den Aminogruppen des Trägers zu einem Säureamid zu reagieren. Im Gegensatz zu den anderen Methoden findet hier eine Trägerbindung ausschließlich über die C-terminale Aminosäure statt.

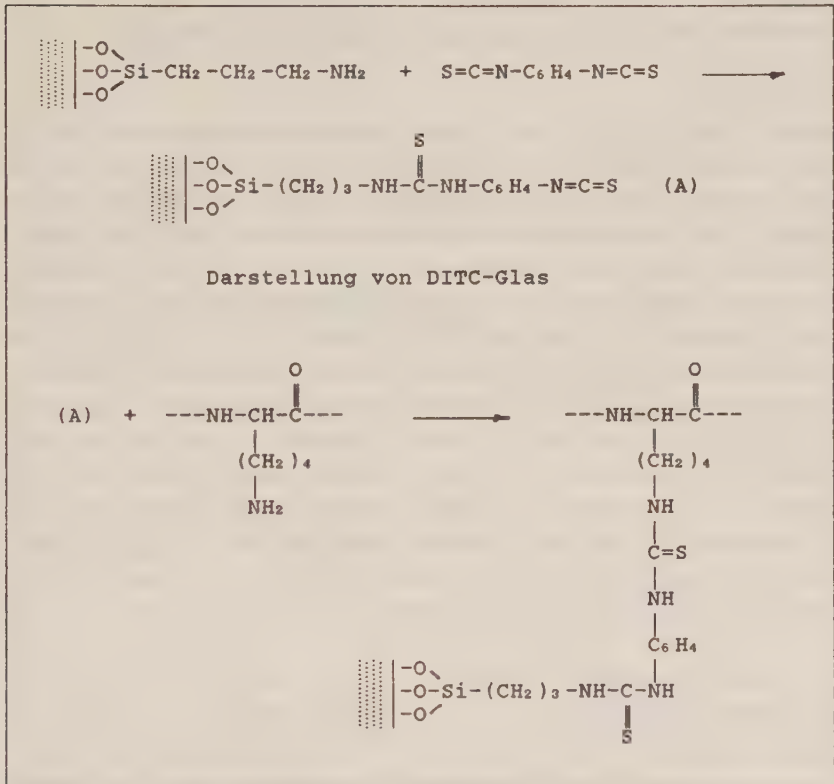


Abb.7 Peptidkopplung über Lys-Seitenketten mit DITC-Glas

Will man die Kopplung über die Aminogruppen des Peptids durchführen, so ist der Einsatz eines bifunktionellen Reagens, Phenylendiisothiocyanat, erforderlich (s. Abb. 7). In der Praxis geht man dabei so vor, daß Aminopropylglas zunächst allein mit dem Reagens umgesetzt und in dieser Form bei Bedarf eingesetzt wird [Wachter et al. 1973]. Im Prinzip wäre auch zunächst eine Reaktion des Peptids oder Proteins mit dem Reagens möglich. Allerdings kann der feste Träger nach der Reaktion sehr viel besser von nur adsorptiv gebundenem DITC gereinigt werden; eine denkbare Quervernetzung, die bei Proteinen auftreten könnte, kann hier ebenfalls nicht stattfinden.

Bedenkt man die zum Teil sehr unterschiedliche Reaktivität der einzelnen funktionellen Gruppen eines Proteins, so ist es klar, daß die Kopplung an den festen Träger der entscheidende Schritt bei der Festphasensequenzierung ist. Gute Kopplungsausbeuten (nahe 100%) können im allgemeinen mit der Fixierung über die Lactone erzielt werden, auch die kovalente Bindung über Aminogruppen an DITC-Glas bewegt sich in ähnlicher Größenordnung. Sehr unterschiedlich dagegen sind die Ausbeuten bei der Reaktion via COOH-Gruppen. Ein Grund dafür ist sicherlich, daß die Aktivierung im sauren Milieu stattfindet, während die Reaktion mit dem Träger einen alkalischen pH erfordert. Zum anderen scheinen die COOH-Gruppen der Proteine im Gegensatz zu den NH_3^+ -Gruppen hinsichtlich ihres pK_s sehr viel empfindlicher auf Wechselwirkungen mit benachbarten funktionellen Gruppen zu reagieren.

Die Adaptierung des N-terminalen Abbaus nach Edman [1950] an den Festphasensequenator ist in Abb. 8 dargestellt. Der mit Protein beladene Träger befindet sich in einer kleinen Glasäule, durch die, über ein Programm gesteuert, die Reagenzien und Waschflüssigkeiten gepumpt werden. Der Sequenator selbst ist eine modifizierte Version des in [Machleidt et al. 1975] beschriebenen Gerätes, das Programm des Abbauzyklus ist in [Wachter & Werhahn 1979] dargestellt.

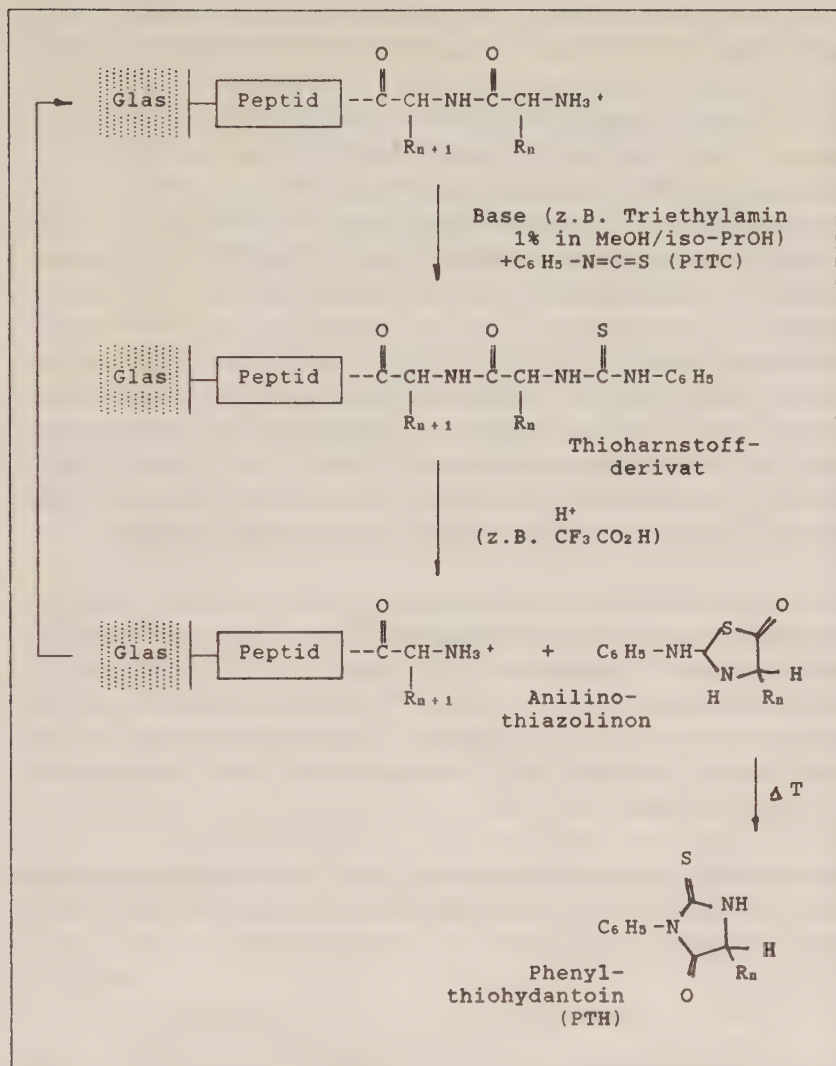


Abb.8 Schema des N-terminalen Abbaus nach Edman

Die Art der eingesetzten Puffer wie auch die Konvertierung der Thiazolinone ist in Teil 2 (Material und Methoden) dieser Arbeit aufgeführt. Für die Detektion der PTHs standen anfäng-

lich drei Methoden zur Verfügung: bei ausreichender Menge konnte ein Teil mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert werden [Summers et al. 1973]. Stand nur wenig Material zur Verfügung, wurde auf dieses Verfahren verzichtet und der Nachweis nur mit Hilfe eines Gaschromatographen und eines Massenspektrometers durchgeführt. Durch Einsatz eines schwefelspezifischen flammenphotometrischen Detektors am Gaschromatographen ist es möglich, die PTHs bis zur Größenordnung von einigen pMol nachzuweisen. Ein weiteres Aliquot wurde mit etwa gleicher Empfindlichkeit an einem Quadrupolmassenspektrometer untersucht, bei dem rechnergesteuert die Signale von 32 Massen über einen bestimmten Zeitraum akkumuliert werden. Lediglich die Derivate des Arg, die auf Grund ihrer geringen Flüchtigkeit bei keiner der beiden letztgenannten Methoden nachweisbar sind, mußten nach Hydrolyse mit HJ an einem Aminosäureanalysator detektiert werden.

Kurz vor Abschluß dieser Arbeit stand unserem Labor ein Hochdruckflüssigkeitschromatograph zur Verfügung, der nach entsprechenden Vorversuchen im allgemeinen an Stelle des Gaschromatographen zur Trennung der PTHs eingesetzt wurde. Dieses Gerät bietet unter anderem den Vorteil, daß Arg-PTH nachgewiesen werden kann und damit die oben beschriebene Hydrolyse überflüssig wird.

Die Identifizierung der PTHs und damit die bestimmbare Länge einer Sequenz wird grundsätzlich durch vier Faktoren limitiert:

1. Von der insgesamt an den Träger gebundenen Menge an Protein reagieren beim ersten Schritt erfahrungsgemäß nur ein Anteil von 10 bis maximal 70% (Initialausbeute).
2. Die Ausbeute an Thioharnstoffderivat (s. Abb. 8) ist immer kleiner als 100%. Das hat zur Folge, daß bei einer repetitiven Ausbeute von beispielsweise 95% die tatsächliche Ausbeute

des 20. Schritts nur noch 36% bezogen auf die Startmenge beträgt.

3. Daraus resultiert ein "Nachhinken", das heißt, bei der Identifizierung des Schritts n erhält man auch ein Signal der Aminosäure n-1. Dieses kann mit zunehmender Länge des Abbaus eine solche Intensität erreichen, daß eine eindeutige Zuordnung unmöglich wird.
4. Durch "unspezifische" acidolytische Spaltungen des trägergebundenen Peptids während der sauren Phase eines Abbauzyklus entstehen Untergrundsignale, die anfangs zunehmen, im weiteren Verlauf der Sequenzierung mit abnehmender Länge des Peptids wieder geringer werden.

Weitere Faktoren, die die Ausbeuten während eines Abbaus empfindlich reduzieren können, sind z.B. die Umwandlung von Gln in Pyrrolidoncarbonsäure, die Konstellation -Asn-Gly- kann zu einem sogenannten "Imidshift" mit der Entstehung einer β -Säureamidbindung führen, die gegenüber PITC nicht mehr reaktiv ist. Ein relatives Hindernis stellt Pro dar, hier hat man im allgemeinen mit einem Abfall der Ausbeute pro Abbauschritt zu rechnen; sind die Positionen dieser Aminosäure innerhalb einer Sequenz bekannt, so kann man an diesen Stellen die Abspaltungsreaktion eines Cyclus entsprechend verlängern.

3.2. Allgemeines zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Mit dem Einsatz der HPLC kann das Spektrum der Separationsmethoden im allgemeinen beträchtlich erweitert und vor allem der damit verbundene Zeitaufwand deutlich verkürzt werden. Es handelt sich hier um eine relativ junge Methodik, die sich in einigen Bereichen bereits fest etabliert hat, auf der anderen Seite aber in einer großen Zahl von Anwendungen noch eine stürmische Entwicklung erfährt. Aus den vielen Variationen an festen Trägern kam in dieser Arbeit in der Hauptsache die sogenannte "reversed phase" Chromatographie zur Anwendung. Hierbei werden als stationäre Phase feinkörnige Materialien (Kieselgel) verwendet, die an ihrer Oberfläche kovalent gebundene Alkylreste aufweisen (C_8 - bzw. C_{18} -Kohlenwasserstoffketten). Diese wurden sowohl für die Analyse der Phenylthiohydantoine wie auch zur Peptidtrennung eingesetzt.

3.2.1. Trennung der PTHs

Die in den beschriebenen Experimenten eingesetzte, über einen Rechner gesteuerte HPLC-Anlage (SP 8000 B von Spectra Physics) erlaubt es, ternäre Gradienten zu bilden (s.3.2.2 Trennung von Peptiden). Die Form der Gradienten ist nahezu beliebig variierbar (linear, konkav, konvex). Die Trennung der PTHs erfolgte in der Hauptsache isokratisch in einem Natriumformiatpuffer (pH 5.2) bei 60°C, die organische Phase (meist MeOH) und die Elutionsrate wurden so gewählt, daß eine befriedigende Separation erreicht wurde. Es war hier nicht unbedingt notwendig, alle PTHs vollständig aufzutrennen, da fast immer durch die zusätzliche Information des Massenspektrometers und gelegentlich des Gaschromatographen die Ergebnisse ergänzt wurden. Die Detektion wurde bei 268 nm durchge-

führt, für die PTHs von Ser und Thr, die in Form von charakteristischen Abbauprodukten eluiert werden, wurde auch noch die Wellenlänge von 313 nm eingesetzt.

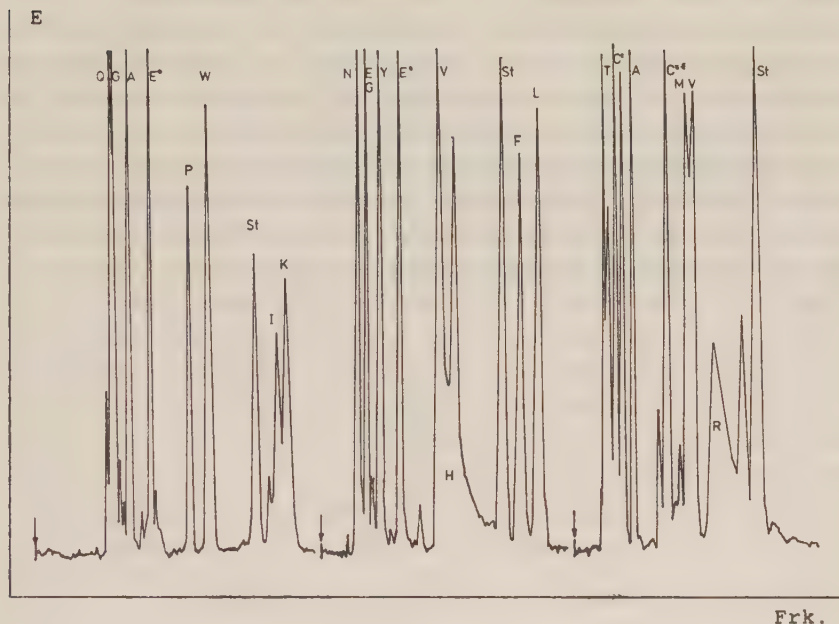


Abb.9 Beispiel für die Trennung von PTHs der Standardamino-säuren auf dem im Text beschriebenen HPLC-Gerät. Gezeigt sind drei Chromatogramme, der Beginn eines Laufes ist jeweils mit einem Pfeil markiert. Die Aminosäuren sind mit ihren Einbuchstaben-Abkürzungen angegeben, E* bedeutet Glu-OMe, C* carboxymethyliertes Cys, C** der entsprechende Methylester, St bezeichnet die Position von Ala-Br-PTH.

Serva RP 18
 50 mM Na-Formiat pH 5.2/MeOH = 6/4 (v/v)
 .9 ml/min
 T = 50°C

Die Injektion der Abbauschritte erfolgte vollautomatisch durch einen Probenaufgeber (WISP, Firma Waters). Für das Sammeln einzelner Fraktionen konnte über ein Programm der

Anstieg der Gipfel in einem Chromatogramm zur Steuerung eines Ventils benutzt werden, das zwischen einem Fraktionssammler und einer Abfalleitung schaltete. Als interner Standard wurde wie auch bei der Analyse durch das Massenspektrometer das para-Br-Phenylthiohydantoin von Ala den einzelnen Proben zugemischt. Auf diesen Wert konnten dann die Retentionszeiten der einzelnen Aminosäuren innerhalb eines Standards bezogen und anschließend in den Abbauschritten verglichen werden. Um eine etwaige Veränderung der relativen Retentionszeiten zu erfassen, wurden diese Standardgemische nach jeder 5. bis 6. Probe zusätzlich aufgetragen. In der Abb.9 sind einige dieser Standardkurven mit den Chromatographiebedingungen gezeigt, wie sie im Verlauf dieser Arbeit verwendet wurden.

3.2.2. Trennung von Peptiden

Eine Möglichkeit zur Trennung insbesondere kleinerer Peptide besteht im Einsatz der bereits oben erwähnten "reversed phase" Chromatographie. Als mobile Phase wird dabei im allgemeinen ein Gradient verwendet, bei dem ein wässriger Puffer ansteigend mit einem organischen Lösungsmittel gemischt wird. Das Trennprinzip beruht darauf, daß Peptide mit der alkylierten Oberfläche des Gels mehr oder weniger starke hydrophobe Wechselwirkungen eingehen, die sukzessive durch den organischen Anteil aufgehoben werden. Bei dieser Methode ist man allerdings auf Peptide bis zu einer bestimmten Größe bzw. Löslichkeit beschränkt, zu großen Molekülen bietet das Gemisch aus wässriger und zunehmend größerem Anteil an organischer Phase im allgemeinen nicht genug Möglichkeiten zur Lösung. In der Literatur werden dafür in der Hauptsache verschiedene wässrige Puffer mit unterschiedlichen pH Werten in Kombination mit Acetonitril beschrieben [siehe z.B. Voelter 1981, Wilson et al. 1981].

Die Möglichkeit, bei dem hier eingesetzten Gerät insgesamt drei Komponenten unabhängig voneinander für einen Gradienten zu mischen, erlaubte es, die organische Phase mit zwei Lösungsmitteln, Methanol und Propanol-(1), zu variieren. Aus Gründen, die weiter unten noch eingehend erläutert werden, sollte man bei der Isolierung von kleinen Peptiden möglichst flüchtige Puffer einsetzen, in unserem Fall wurde eine Ammoniumtrifluoracetat-Lösung (pH 3.0, Stammlösung 0.5 M, auf 20 mM verdünnt) verwendet. Das in Labors übliche, durch Ionenaustauscher entsalztes Wasser muß durch Filtration an Kartuschen (Millipore) nachgereinigt werden, andernfalls kann bei der photometrischen Detektion der Peptidbindung zwischen 200 und 220 nm keine stabile Basislinie erreicht werden. Bei dieser Wellenlänge können auch Peptide ohne aromatische Aminosäuren mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden, ander-

erseits ist man natürlich mit der Wahl der Lösungsmittel dadurch etwas eingeschränkt. Um weiterhin während einer Chromatographie eine Drift der Basislinie zu vermeiden, wurden Methanol und Propanol mit der Stammlösung des Ammoniumtrifluoracetats auf die gleiche Extinktion bei der entsprechenden Wellenlänge wie der wäßrige Puffer eingestellt.

In Vorversuchen wurden Trennungen mit den CNBr-Peptiden des Myoglobins und den tryptischen Fragmenten von Rinderserumalbumin durchgeführt. Dabei wurden bei einem definierten Gradienten die Gemische getrennt, zu Beginn und nach jeder Trennung lief ein "Leerwert", d.h. nur Injektion des Lösungsmittels (10% HOAc) auf die Säule. Anschließend erfolgte eine Änderung des Gradienten und der oben beschriebene Cyclus wurde erneut durchgeführt. Eine Zusammenstellung einiger Säulenläufe mit den entsprechenden Daten ist in der Abb.10 gezeigt.

Bei der Auswertung einzelner gesammelter Fraktionen mit der Dansylmethode und durch Aminosäurenanalyse zeigte sich, daß selbst mit einem gut flüchtigen Puffer nach Einengen noch störende Bestandteile (NH_4^+ -Ionen) zurückbleiben können; das gesammelte Volumen einer Fraktion betrug z.T. einige ml. Daher wurden in der Folge diejenigen Peptide, von denen eine genaue Analyse angefertigt werden mußte, noch über ein kleinporiges Gel entsalzt. Die Ausbeuten nach den Trennungen bewegten sich in der Größenordnung zwischen 50 und 70%.

zu Abb.10a (S.63) und 10b (S.64); Chromatographiebedingungen:

Messung der Extinktion bei 220 nm

Serva RP-8

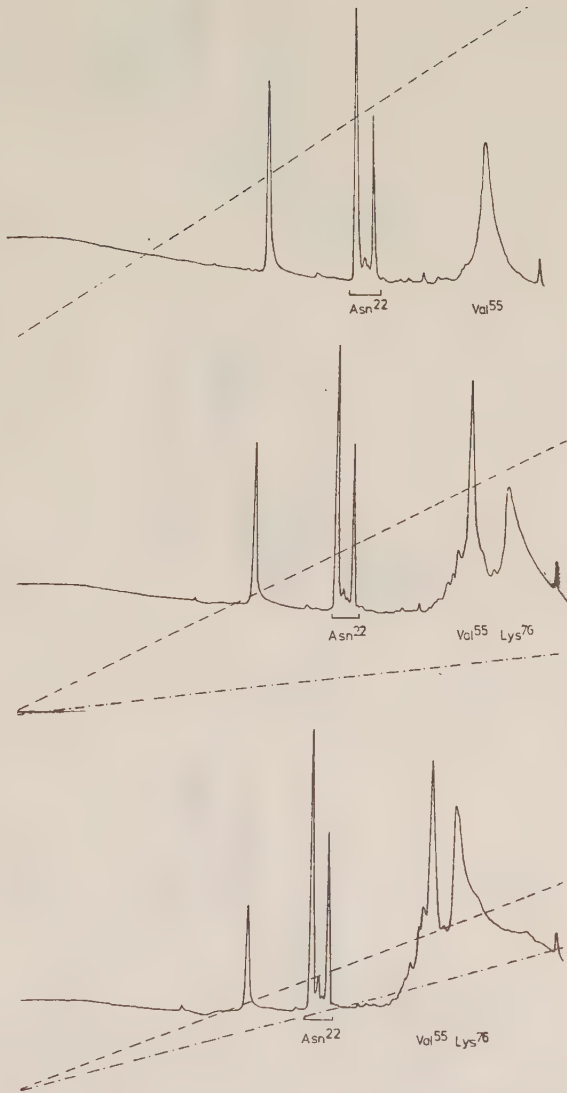
20 mM Ammoniumtrifluoracetat pH 3.0

.7ml/min

T = 45°C

	Gradienten		
	I	II	III
MeOH (-----)	0 - .98	.0 - .78	.0 - .58
PrOH (-.-.-)	-	.0 - .2	.0 - .4

E



Frk.

Abb.10a HPLC-Chromatographien der CNBr-Peptide von Myoglobin

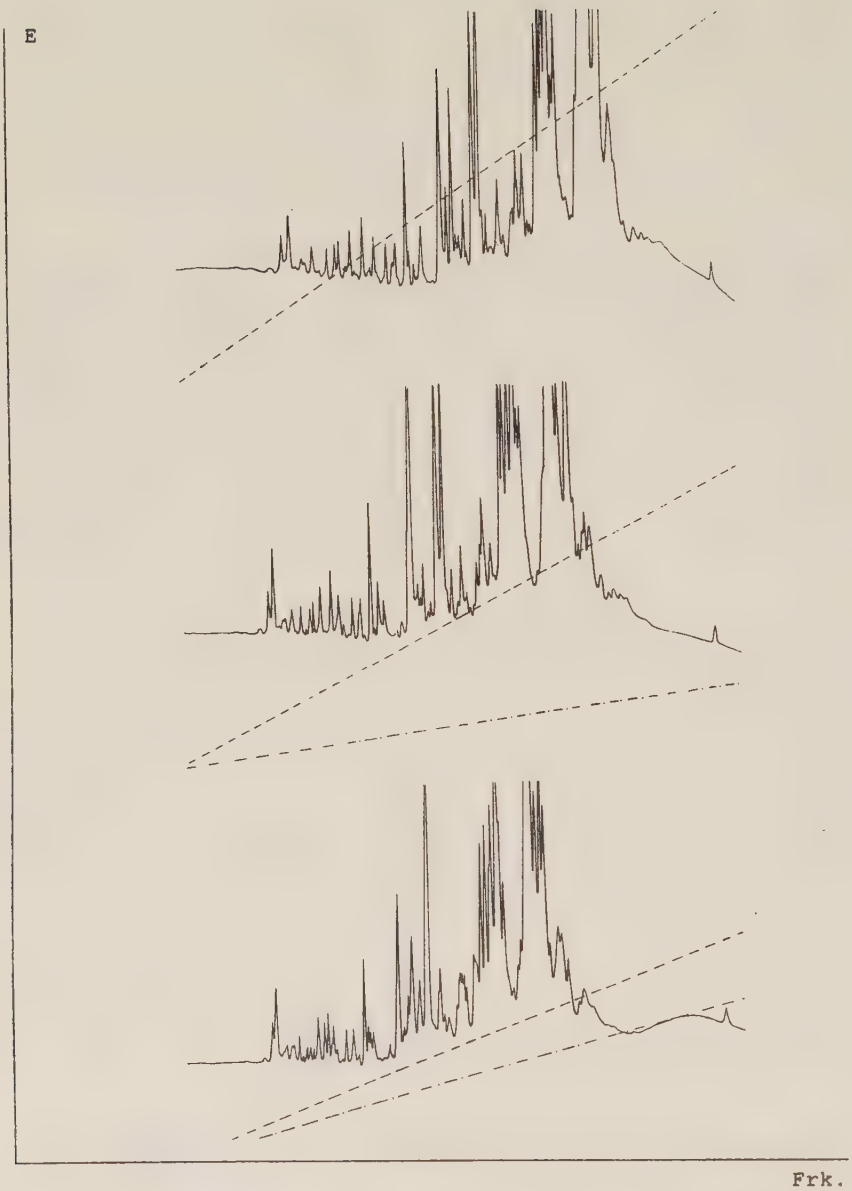


Abb.10b HPLC-Trennung der tryptischen Peptide von Rinder-serumalbumin.

Das Retentionsverhalten von Peptiden in Abhängigkeit von ihrer Aminosäurezusammensetzung ist in der Literatur mehrfach beschrieben [Meek & Zvani 1981].

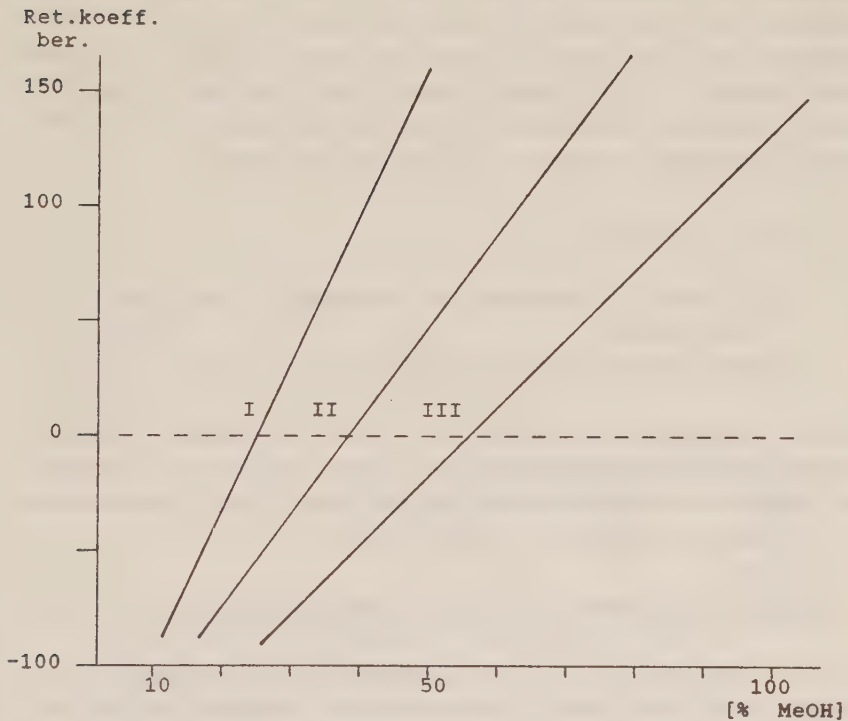


Abb.11 Zusammenhang zwischen berechneten Retentionskoeffizienten nach [Meek & Zvani 1981] und dem Anteil an MeOH in der organischen Phase. Die Zahlen I, II und III beziehen sich auf die in der Abb.10a angegebenen Gradienten.

Dabei zeigt sich, daß den einzelnen Aminosäuren Werte zugeordnet werden können, deren Addition einen Gesamtretentionskoeffizienten für das jeweilige Peptid ergibt. Dieser steht in einem linearen Zusammenhang mit dem Anteil an organischer Phase des Gradienten. Von den angegebenen Werten (für Chromatographie mit NaClO_4 oder NaH_2PO_4 mit CH_3CN) ergab sich bei einem Vergleich zwischen berechneten Retentionszeiten für die eingesetzten Testpeptide und Anteil der organischen Phase (Abb.10) die beste Korrelation für die bei NaClO_4 bestimmten Koeffizienten (s. Abb.11, Korrelationskoeffizient in allen drei Fällen $> .990$) [Meek & Zvani 1981]. Berücksichtigt man nur die Ausgleichsgerade I der Abb.11 (Gradient von 0 - 98% MeOH, kein ProH) so gehorcht diese der Gleichung

$$\text{RT} = 319.2 [\text{MeOH}] - 165.5$$

RT = nach Literaturwerten berechneter Retentionskoeffizient

[MeOH] = Volumenanteil an MeOH im Gradienten

Da der Zusammenhang zwischen dem Anteil an Propanol und den Retentionskoeffizienten ebenfalls linear sein sollte, wurden die Werte der Kurven II und III der Abb.11 wie folgt gegen die Propanolkonzentration aufgetragen:

$$\text{RT} - 319.2 [\text{MeOH}] + 165.5 = a [\text{ProH}] + b$$

wobei a der Steigung, b dem Achsenabschnitt der Ausgleichsgeraden und [ProH] dem Volumenanteil an Propanol entspricht. Dieser Zusammenhang ist in der Abb.12 dargestellt. Nach Berechnung der Ausgleichsgeraden ergab sich hier ein Korrelationskoeffizient von .994. Als Konsequenz ergibt sich damit, daß bei einem System mit zwei beliebig mischbaren organischen Phasen folgende allgemeine Gleichung gilt:

$$z = a + b x + c y$$

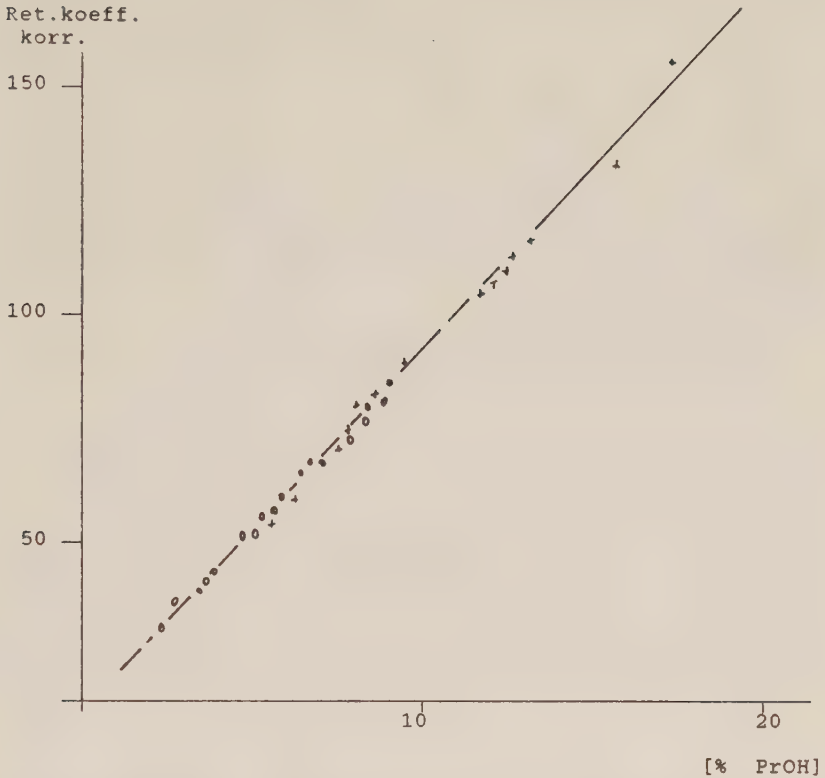


Abb.12 Zusammenhang zwischen dem Anteil an PrOH und den korrigierten Retentionskoeffizienten (s.Text).

• Werte nach II der Abb.11

+ Werte nach III der Abb.11

x, y: Variable

z: Abhängige

a, b, c: Parameter

Bildet man hier wie üblich die Summe der Fehlerquadrate mit anschließender partieller Differenzierung nach den Größen a,

b und c und setzt die so erhaltenen Gleichungen gleich null (Minimum der Fehlerquadrate), so ergibt sich:

$$\begin{aligned} I_z &= a n + b I_x + c I_y \\ I_{xz} &= a I_x + b I_{x2} + c I_{xy} \\ I_{yz} &= a I_y + b I_{xy} + c I_{y2} \end{aligned}$$

Für x, y und z sind jeweils $\text{AMEOH}\ddot{\text{U}}$, $\text{APROH}\ddot{\text{U}}$ und RT einzusetzen; a, b und c können somit bestimmt werden. Bei der Durchführung dieser Berechnung für die in Abb.10 gezeigten Chromatographien ergab sich :

$$\text{RT} = 306.0 \text{ AMEOH}\ddot{\text{U}} + 785.4 \text{ APROH}\ddot{\text{U}} - 156.6$$

	Asn ²²		Val ⁵⁵		Lys ⁷⁶	
	38.1		110.0		134.6	
	M/Pexp	Pber	M/Pexp	Pber	M/Pexp	Pber
I	.635/.0	.0	.86 /.0	.004	(.956/.0)	
II	.45 /.069	.073	.632/.097	.093	.684/.105	.104
III	.311/.129	.127	.433/.179	.171	.457/.189	.193
	.6 /.0	.014	.6 /.164	.106	.6 /.199	.137
	.572/.0	.025	.6 /.129	.106	.6 /.141	.137
	.402/.103	.091	.3 /.42	.223	-	
	.247/.148	.152	.431/.258	.172	.469/.281	.188
	.198/.179	.171	.338/.305	.208	.35 /.315	.234
	.271/.163	.142	.481/.289	.152	-	

Tab.5 Vergleich zwischen experimentellen und berechneten Werten für die PROH -Konzentration zur Elution der CNBr -Peptide des Myoglobins. Die Peptide sind mit ihrem N-Terminus und mit der Anzahl der Aminosäuren abgekürzt, in der zweiten Zeile stehen die nach $\text{Meek \& Zvani 1981}\ddot{\text{U}}$ bestimmten Retentionskoeffizienten. M bzw. P bedeuten die Anteile von MeOH und PROH , die berechneten Werte für PROH ergeben sich nach Einsetzen von RT und MeOH in die im Text angegebene Gleichung. Die Zeilen I, II und III beziehen sich auf die in der Abb.10a gezeigten Chromatographien.

In Tab.5 ist ein Vergleich der experimentellen Werte für die Anteile an MeOH und ProOH mit den errechneten Anteilen an ProOH für eine gegebene MeOH-Konzentration und einem bestimmten Retentionskoeffizienten aufgestellt.

Da die in Abb.10 beschriebene Säule kurze Zeit später einen erhöhten Gegendruck entwickelte und nicht mehr verwendet werden konnte, mußten weitere des gleichen Typs eingesetzt werden. Die Testläufe auf diesen Säulen sind in der Tab.5 in den Zeilen nach III gezeigt. Die für I, II und III berechneten Werte stimmen recht gut mit dem Experiment überein, für das kleinste Peptid, Asn₂₂, ist auch bei späteren Säulenläufen eine befriedigende Übereinstimmung festzustellen. Dies trifft für die beiden größeren CNBr-Peptide nicht mehr zu. Hier ist zwar innerhalb der ersten Serie (I - III) der Vergleich zwischen experimentellen und errechneten ProOH-Werten gut, für die weiteren Säulenläufe allerdings unbefriedigend. Das bedeutet, daß trotz gleicher Herstellung die Materialien doch recht deutliche Unterschiede aufweisen können, zum anderen kamen in den Peptidtrennungen nur solche Säulen zum Einsatz, die keine ausreichende Trennfähigkeit mehr für PTHs aufwiesen, also eine unterschiedliche Vorbehandlung erfahren hatten.

3.3. Isolierung der δ -Untereinheit aus F1

Die Reindarstellung von F1 wurde nach einem Verfahren durchgeführt, das von G. Wild [1980] in unserem Labor entwickelt wurde. Danach erhält man im Fall des roten Brotschimmels *Neurospora crassa* maximale Ausbeuten sowohl an Gesamtprotein wie auch an enzymatischer Aktivität, wenn man ganze Mitochondrien zunächst bei 0°C in einem hypotonen Medium inkubiert und diese Suspension anschließend mit CHCl_3 ausschüttelt.

Mitochondrien (10 gr.) in Med I, 2 mM ATP

↓ Zentrifugation (17 000 g, 12')

Mitochondrien in Med II, 0°C, 30'

↓ Zentrifugation (17 000 g, 12')

Mitochondrien in Med II + gleiches Volumen CHCl_3 ,
bei Raumtemperatur für ca. 5' geschüttelt

↓ Zentrifugation (17 000 g, 12')

CHCl_3 - und Zwischenphase verwerfen,
wässriger Überstand (1960 mg.) auf DEAE-Cellulose

↓ Ionenaustauschchromatographie mit
stufenweiser Elution: 1. Med II
2. Med II, 30 mM KCl
3. Med II, 300 mM KCl

F1-Rohfraktion (730 mg.)

↓ Molekülsieb A 0.5 m

reines F1 (400 mg.)

Tab.6 Schema zur Isolierung der löslichen ATPase aus *N. crassa*. Med I und Med II bezeichnen die in Material & Methoden beschriebenen isotonen bzw. hypotonen Puffer

Die Aufarbeitung des dabei erhaltenen wäßrigen Überstands lehnt sich an klassische Verfahren an [Übersicht bei Penefsky 1979, Senior 1979]. Die Tab.6 gibt eine Übersicht über den Präparationsweg. Die Mengenangaben entsprechen dem Mittelwert aus 25 Präparationen. Als Reinheitskriterium wurden NaDodSO_4^- -Gelelektrophoresen von definierten Fraktionen der Säulenläufe durchgeführt und mit denen aus [Wild 1980] verglichen.

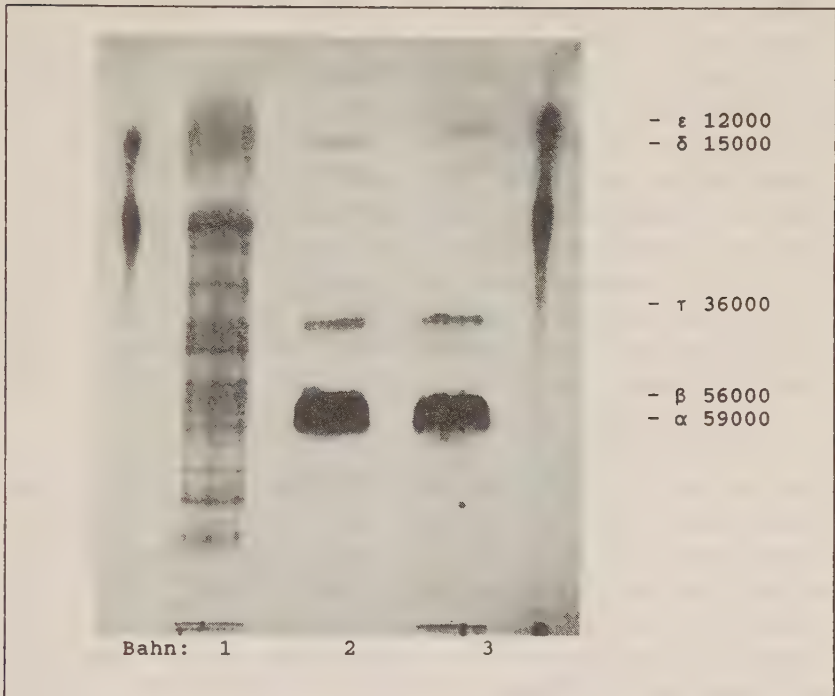


Abb.13 NaDodSO_4^- -Elektrophorese der F_1 -ATPase

Bahn 1: wäßriger Überstand nach CHCl_3 -Behandlung

Bahn 2: F_1 nach Chromatographie DEAE-Cellulose und Biogel A 0.5m, aufsteigende Flanke aus dem Hauptgipfel des Chromatogramms.

Bahn 3: wie Bahn 2, abfallende Flanke aus dem Hauptgipfel

In Abb.13 ist das Proteinmuster des Hauptgipfels nach der Chromatographie an Biogel A-0.5 m gezeigt. Die nur unvollständige Trennung der α - und β -Bande liegt erstens an den sehr ähnlichen Molekularmassen der beiden Proteine (59000 und 56000), zweitens wurde in der Regel soviel Protein aufgetragen, daß die Reinheit im niedermolekularen Bereich (δ und ϵ) sicher zu beurteilen war. Zum Vergleich und zur qualitativen Dokumentation der Anreicherung ist hier zusätzlich noch das Proteinmuster des wässrigen Überstands nach der Chloroformbehandlung mit angegeben. Da zwar der intakte F_1 -Komplex wasserlöslich ist, seine einzelnen Untereinheiten dagegen nicht, wurde ursprünglich für die quantitative Dissoziation der löslichen ATPase Detergentien in möglichst geringer Konzentration eingesetzt [Wild 1980]. So gelang es, mit Zusatz von NaDodSO_4 α , β , τ , δ und ϵ nach diversen Säulenchromatographien rein und mit annähernd nativer Konformation, aber nur in geringer Ausbeute darzustellen. Da in unserem Fall der Schwerpunkt mehr auf optimaler Ausbeute an Protein als auf der Erhaltung der ursprünglichen Konformation lag, wurde versucht, das Verfahren möglichst abzukürzen, um die zum Teil erheblichen Proteinverluste bei den Säulenchromatographien zu vermeiden.

Eine obligate Voraussetzung für das Arbeiten im proteinchemischen Rahmen ist der Einsatz von flüchtigen Puffern, da andernfalls die Trennung und Isolierung von zum Teil sehr kleinen und nur in geringer Menge vorliegenden Spaltpeptiden praktisch unmöglich ist. Daher wurde als erstes versucht, den gesamten F_1 -Komplex in einem solchen Medium zu dissoziieren und in Lösung zu halten.

In Vorversuchen wurde dies mit konzentrierten organischen Säuren (80% HOFo) durchgeführt und zur Gewinnung der kleinen Untereinheiten Molekularsiebe mit dem entsprechenden Trennbereich (Biogel P-30) eingesetzt. Abb.14 zeigt das Chromatogramm eines Säulenlaufes, bei dem die Absorption bei 280 nm und der Brechungsindex registriert wurden. Leider ergab die Analyse einzelner Fraktionen mit einer NaDodSO_4 -Harnstoff-

Gelelektrophorese, daß erstens im Bereich der drei großen Untereinheiten bereits eine beträchtliche acidolytische Spaltung stattgefunden hatte, zweitens die Dissoziation auch in diesem Lösungsmittel nicht vollständig ist und drittens die Abtrennung der δ -Untereinheit vom vorhergehenden großen Proteingipfel nur unvollständig stattfindet.

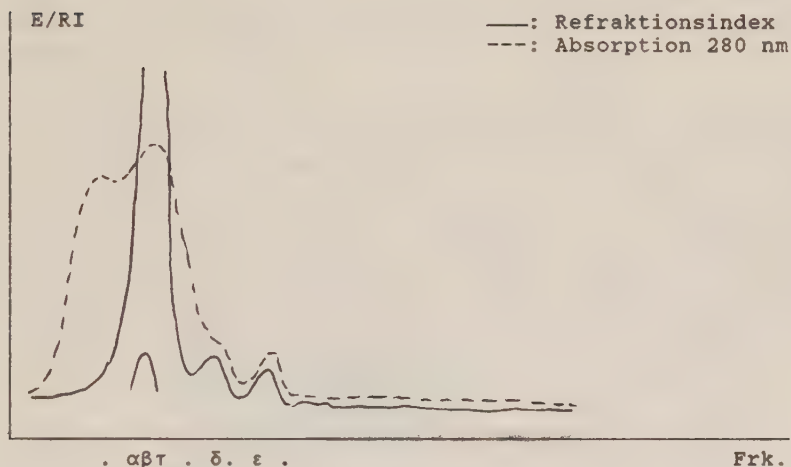


Abb.14 Analytische Trennung der Untereinheiten aus F_1

Matrix: Biogel P-30
 Säule [ϕ x Länge]: 0.4 x 150 cm
 Laufmittel: 80% HOAc
 Flußrate: 0.4 ml/h

Unter der Annahme, daß in wäßrigen Systemen die Löslichkeit der beiden kleinen Untereinheiten größer als die der restlichen ist, wurde der gesamte F_1 -Komplex einmal in 10% HOAc und zum anderen in 50% Pyridin jeweils für 8 h bei 56°C inkubiert. Nach Zentrifugation ergab die Analyse des klaren Überstands mittels Gelchromatographie und Elektrophorese für den Pyridinpuffer eine geringe Lösung der ϵ -Untereinheit, während im Fall der 10% HOAc keine nachweisbaren Proteinmengen zu finden waren. Auch die Behandlung mit eher unpola-

ren Lösungsmitteln, wie etwa Propanol/HOFO (3/7, v/v) brachte keinen Erfolg.

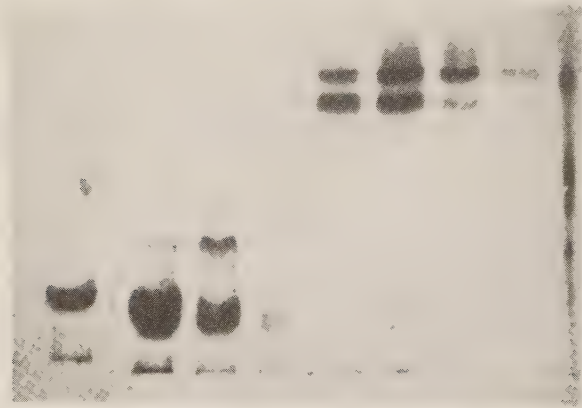
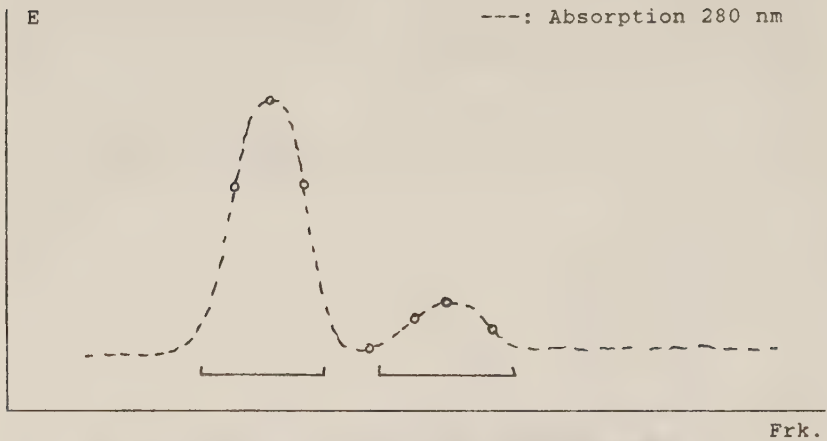


Abb.15 Fraktionierung der Untereinheiten aus F₁
Die im Chromatogramm markierten Fraktionen entsprechen in der gleichen Reihenfolge den jeweiligen Bahnen auf der Gelelektrophorese

Sephadex G-100 f
3.0 x 150 cm
30 mM Tris/HCl, 1% NaDodSO₄, pH 8.0
28 ml/h

Somit war es notwendig, eine Vortrennung der Untereinheiten analog zu [Wild 1980] vorzunehmen. Hierbei findet die Dissoziation in einer gepufferten 4% NaDodSO₄-Lösung statt, während die Fraktionierung des Proteingemisches auf Sephadex G 100 in 1% NaDodSO₄-Tris-Puffer durchgeführt wird (s. Abb. 15). Wie aus dem elektrophoretischen Muster ersichtlich, enthält der erste Gipfel die drei großen Untereinheiten, während δ und ϵ gemeinsam im zweiten Gipfel eluiert werden. Anschließend wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und gefriergetrocknet.

Um eine NaDodSO₄-freie Proteinfraction aus dem Lyophilisat zu erhalten, wurde dieses zunächst in einem möglichst geringen Volumen Wasser gelöst und das Protein mit Aceton/H₂O (9/1, v/v, Endkonzentration) bei 0°C gefällt. Die Untereinheiten können nahezu quantitativ im Niederschlag wiedergewonnen werden, während das Detergens in Lösung bleibt. Von diesem Punkt der Präparation an war es dann möglich, aus den oben beschriebenen Gründen in flüchtigen Puffern zu arbeiten.

Da die Vorversuche ergeben hatten, daß auch die zwei kleinen Untereinheiten nur eine geringe Löslichkeit in verdünnten wäßrigen Lösungen aufweisen, wurde ihre Trennung in 80% HOFo durchgeführt. Mit diesem Solvens werden schon seit Jahren gute Erfahrungen gemacht [Rückel 1980], insbesondere wenn es um Strukturaufklärung extrem hydrophober Membranproteine, wie z.B. das Proteolipid aus dem F₀-Sektor der H⁺-ATPase [Sebald et al. 1980], geht. Allerdings ist man damit in der Wahl der Trennmedien stark eingeschränkt. Zu Beginn dieser Arbeit konnten von den kommerziell erhältlichen Produkten lediglich die auf Polyacrylamidbasis hergestellten Molekülsiebe und von diesen auch nur diejenigen mit kleineren Porengrößen eingesetzt werden. Das Gel mit dem für dieses Trennproblem in Frage kommenden Fraktionierungsbereich (Biogel P-30) konnte allerdings von der Herstellerfirma nicht mehr mit der Stabilität hergestellt werden, die für die Chromatographie in organischen Säuren notwendig ist [Sebald et al. 1980].

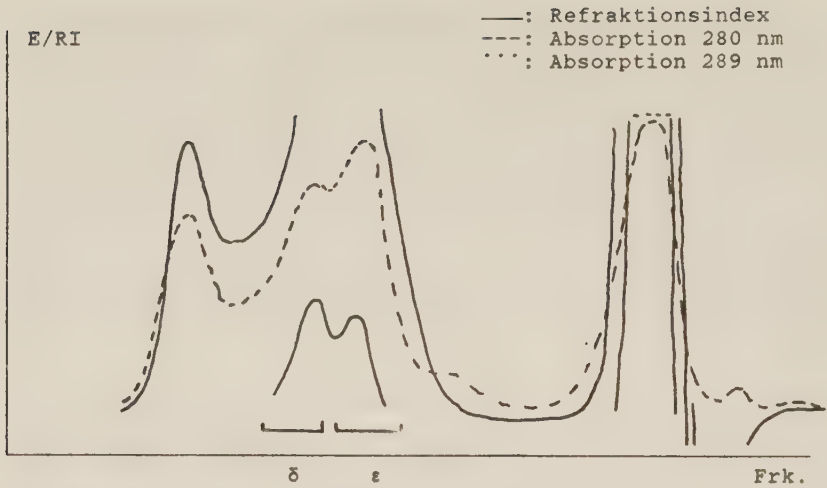


Abb.16a Gelchromatographische Trennung der zwei kleinen Untereinheiten δ und ϵ

Sephacryl S-200
 0.8 x 150 cm
 80% HOFo
 1.5 ml/h

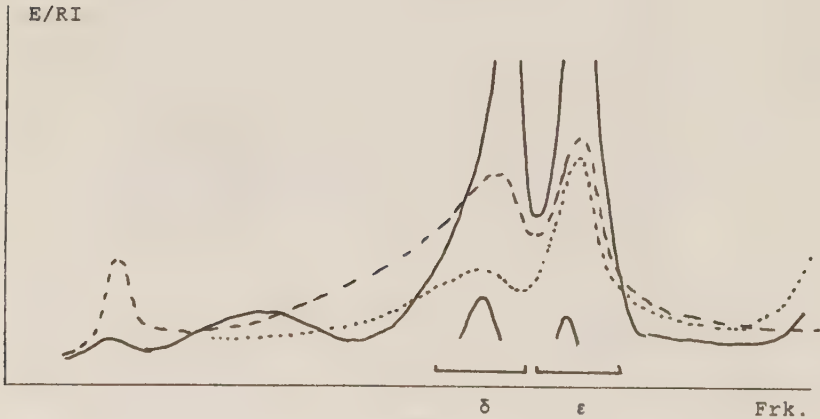


Abb.16b Bedingungen wie oben bis auf Säulendimensionen

1.2 x 250 cm
 2.4 ml/h

Nach Untersuchungen an verschiedenen neuen Präparaten fiel die Wahl auf ein Copolymerisat aus Dextran und Polyacrylamid (Sephacryl S-200), das eine sehr gute Stabilität, auch bei höheren hydrostatischen Drucken, zeigt. In der Abb.16 wird die Trennung von δ und ϵ mit Hilfe dieses Gels demonstriert. Die, verglichen mit anderen Molekülsieben ähnlicher Porengröße, beachtliche Resistenz gegenüber erhöhtem hydrostatischen Druck erlaubt es, die Säulenlänge so zu wählen, daß eine optimale Auftrennung der beiden Peptide möglich ist (vgl. Abb.16a und b). Die Zuordnung der Fraktionen erfolgte durch die Bestimmung der bekannten N-terminalen Aminosäuren und durch Aminosäurenanalyse [Wild 1980] (s. Tab.7).

	I	II
Cys	-	.3
Asx	7.6	6.2
Thr	2.4	.7
Ser	7.6	9.7
Glx	15.1	18.7
Pro	4.0	3.8
Gly	8.6	8.0
Ala	13.1	12.1
Val	9.7	12.1
Met	.7	.8
Ile	5.8	6.2
Leu	9.3	8.8
Tyr	1.6	2.0
Phe	2.9	2.4
His	1.7	1.7
Lys	6.5	5.6
Arg	3.4	.9

Tab.7 Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der δ -Untereinheit (Angaben in Mol-%)

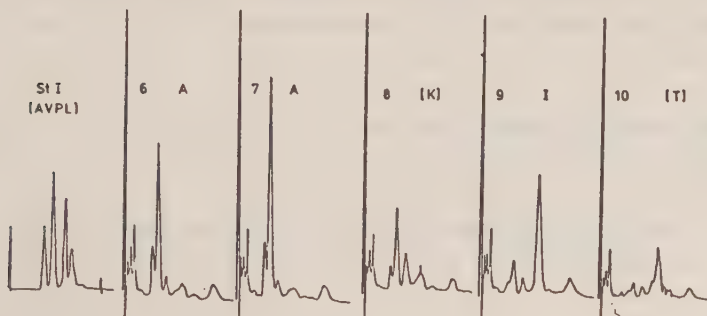
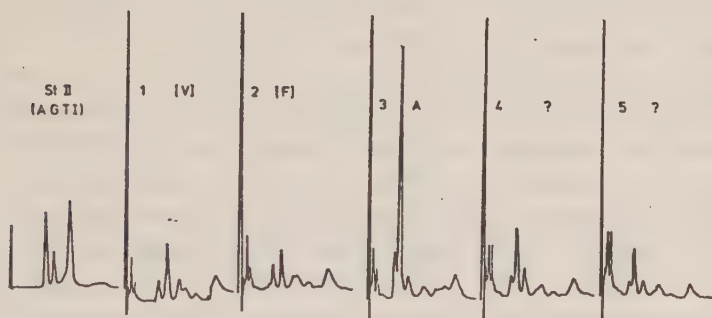
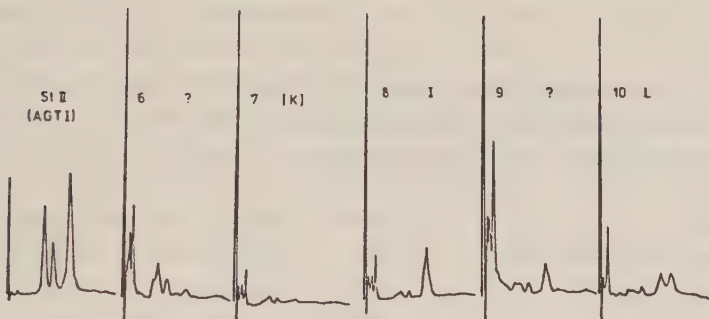
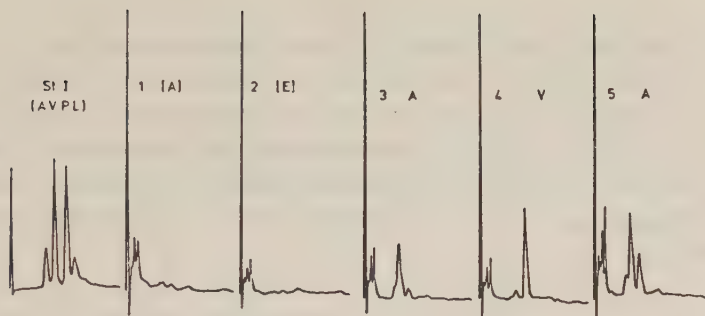
I: Mittelwerte aus 17 eigenen Präparationen
 II: Vergleichswerte nach [Wild 1980]

Die Frage, ob die so erhaltenen Proteine eine für die Strukturbestimmung ausreichende Reinheit aufweisen oder ob weitere Reinigungsschritte erforderlich sind, wurde wie folgt beantwortet: entsprechende Aliquots von den in Abb.16b angegebenen vereinigten Fraktionen wurden unter identischen Bedingungen über Aminogruppen an DITC-Glas gekoppelt. Die jeweils ersten zehn Schritte nach Edman Abbau sind anhand der Gaschromatogramme in Abb.17 dargestellt. Die Bestimmung der relativen Retentionszeiten geschieht mit Standards (St.I, St.II s.Abb. 17), die im Verlauf immer wieder in den Gaschromatographen injiziert werden. Die identifizierten Aminosäuren sind mit ihren Einbuchstabenabkürzungen angegeben, die in eckigen Klammern wurden entweder bei erhöhter Temperatur (F, E) oder aber durch das Massenspektrometer (K) bestimmt. Sowohl die Temperatur wie auch die Art der stationären Phase sind in diesem Fall der Grund für das Auftreten von zwei Gipfeln bei einigen Derivaten (Ala, Leu). Da bei der Kopplung an DITC-Glas natürlich auch der N-Terminus mit dem Träger eine Reaktion eingehen kann, ist es möglich, daß der erste Abbau-schritt kein PTH enthält (s.Abb.17, Zeile 1, Schritt 1).

Im Fall der δ -Untereinheit (Abb.17 Zeile 1 und 2) zeigen die Abbauschritte eine ausreichende Reinheit des isolierten Peptids an. Die ab Schritt 4 zusätzlich auftretenden Nebensignale entsprechen dem oben beschriebenen "Nachhinken" der Sequenz. Beim Abbau von ϵ (Abb.17, Zeile 3 und 4) zeigt sich zwar vom ersten Schritt an ein beträchtlicher Untergrund, doch ist auch hier das Verhältnis zum echten Signal (z.B. in Schritt 3) so, daß eine mühelose Identifizierung möglich ist.

Abb.17 (S.79) Gaschromatographische Identifizierung der jeweils ersten zehn Schritte der kleinen Untereinheiten. Zeile 1 und 2 entsprechen der Untereinheit δ , in Zeile 3 und 4 sind die ersten Aminosäuren von ϵ angegeben.

Shimadzu GC-6A, schwefelspezifischer flammenphotometrischer Detektor, isotherme Trennung bei 200°C



Die quantitative Bestimmung der gereinigten δ -Untereinheit ergab einen Wert von etwa 310 nmol bezogen auf 400 mg F_1 . Unter Berücksichtigung der möglichen Stöchiometrien des F_1 -Komplexes berechnen sich somit Ausbeuten von etwa 30% ($\alpha:\beta:\delta:\gamma:\epsilon = 3:3:1:1:1$). Um die Ursache für diesen doch recht beträchtlichen Verlust aufzuklären, wurde versucht, während einiger Präparationen die entscheidenden Schritte quantitativ zu verfolgen.

Die Proteinbestimmung bis zur Isolierung der reinen löslichen ATPase (s.Tab.6) erfolgte nach der Methode von Lowry [Lowry et al. 1951]. Da dies eine relative Messung ist, wurde, wie üblich, als Bezugsgröße Rinderserumalbumin verwendet. Nun ist aber bekannt, daß die Unterschiede zu Werten, wie sie beispielsweise nach Aminosäurenanalyse erhalten werden, beträchtlich sein können [Graf pers. Mitteilung]. Damit war es unmöglich, die dissoziierten Untereinheiten vor und nach der Trennung auf Sephadex G 100 zu quantifizieren (NaDodSO_4 , 2-Mercaptoethanol). Auch der Versuch, die Ausbeuten anhand der Extinktion bei 280 nm zu verfolgen, schlug fehl, da einmal der zur Lösung von F_1 eingesetzte Puffer ATP enthielt und zum anderen die Menge an proteingebundenem ATP und ADP nicht bekannt war. Um mögliche Verluste bei der Fällung mit Aceton auszuschließen, wurde der Überstand am Rotationsverdampfer auf wenige ml eingengt und elektrophoretisch untersucht. In keinem der untersuchten Fälle war Protein nachweisbar. Die Kontrolle des letzten Reinigungsschrittes (Chromatographie an Sephacryl S-200 in 80% HOFO) ergab sowohl nach Extinktionsmessung wie auch nach Aminosäurenanalyse (s. unten) eine nahezu vollständige Elution der Peptide. Voraussetzung hierfür war allerdings, daß das verwendete Gel nicht zu lange der Ameisensäure ausgesetzt war.

Zusammenfassend ergeben sich damit als mögliche Verlust- bzw. Fehlerquellen folgende Punkte:

1. nur relative Quantifizierung mit der Methode nach Lowry möglich

2. unvollständige Elution der Proteine bei der Chromatographie in Detergentien an Sephadex G 100
3. minimale Verluste beim Vereinigen entsprechender Fraktionen nach Sephacryl S-200, da ansteigende bzw. abfallende Flanken der Proteingipfel im allgemeinen verworfen wurden.
4. zu hoher Ausgangswert durch Kontamination des F_1 mit Nukleotiden (nach A-0.5 m und DEAE-Cellulose).

Das größte Gewicht muß hier wohl dem Punkt 4. zugemessen werden, es ist bekannt, daß Nukleotide die Messung mit dem Folin-Phenol Reagens verfälschen können [Peterson 1979].

3.4. Charakterisierung der δ -Untereinheit

Wie bereits oben beschrieben, kann die δ -Untereinheit bei Beschränkung auf flüchtige Puffer erst in höher konzentrierten organischen Säuren gelöst werden. Um z.B. eine 1mM Lösung des Proteins herzustellen, war eine Mindestkonzentration von etwa 60 - 70% Ameisensäure erforderlich. Die Stabilität des Proteins gegenüber acidolytischen Spaltungen ist dergestalt, daß auch eine Rechromatographie im gleichen System, wie sie anfangs notwendig war (s. Abb.16a), entsprechend der Aminosäurenanalyse keine nennenswerte Verluste ergab.

In diesem Zusammenhang ist festzuhalten, daß anfänglich die durch Chromatographie gereinigten Fraktionen sich nach Einengen am Rotationsverdampfer als völlig unlöslich erwiesen. Selbst mit Medien wie wasserfreie Trifluoressigsäure, 6M Harnstoff oder Guanidin-hydrochlorid, und Detergentien, wie NaDodSO₄ oder Triton X-100, war auch bei erhöhter Temperatur keine Resolution zu erreichen. Als Ursache dafür konnte schließlich die Ameisensäure verantwortlich gemacht werden. So ergab die fraktionierte Destillation des kommerziellen Lösungsmittels (Merck, p.A. Qualität) nach Übergehen des Hauptbestandteils bei ca. 100°C eine kleine, schwerer flüchtige Restfraktion, die Proteine (z.B. auch Myoglobin, Rinder-serumalbumin) zu einem hochpolymeren und damit völlig unlöslichen Film vernetzte. In der Folge wurde daher selbst hochreine Ameisensäure grundsätzlich destilliert.

Zur Überprüfung der Reinheit des Proteins wurden routinemäßig Elektrophoresen und die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure mit der Dansylmethode [Gray 1972] bzw. der Anfangsequenz mit der manuellen Sequenzierung nach Chang [Chang et al. 1978] durchgeführt. Als zusätzliches Kriterium wurden Aminosäureanalysen angefertigt.

Cys	0.0
Asx	10.8
Thr	3.4
Ser	10.8
Glx	21.4
Pro	5.7
Gly	12.2
Ala	18.6
Val	13.8
Met	1.0
Ile	8.2
Leu	13.1
Tyr	2.3
Phe	4.1
His	2.4
Lys	9.2
Arg	4.8

AS	142
MG	15 103
Pol.	44%

Tab.8 Aminosäurezusammensetzung der δ -Untereinheit bei einem Molekulargewicht von 15000

Laut Elektrophorese besitzt die δ -Untereinheit ein apparentes Molekulargewicht von 15 000, ein Wert, der sich mit dem aus der Gelchromatographie erhaltenen deckt. Legt man diese Größe zugrunde, so ergibt sich die in Tab.8 gezeigte Aminosäurezusammensetzung. Auffallend ist hier der vergleichsweise hohe Anteil an sauren Aminosäuren bzw. deren Amide (ca. 23%) gegenüber den basischen (ca. 12%). Cys und Trp fehlen, Met ist lediglich einmal pro Molekül vorhanden. Der Gehalt an Ala ist relativ hoch, er macht allein etwa 1/4 der unpolaren Aminosäuren aus. Der Prozentsatz der polaren Aminosäuren beträgt 44%, die δ -Untereinheit gehört damit, nach der Definition von Capaldi und Vanderkooi [1972], zu den "löslichen" Proteinen. Allerdings können auch intrinsische Membranproteine, wie etwa der ATP/ADP-Translokator aus der inneren Mitochondrienmembran, Polaritäten dieser Größenordnung aufweisen (z.B. 41% bei *Neurospora crassa* [Hackenberg et al. 1978]), aber auch dieser kann nur in Gegenwart von Detergentien oder aber konzentrierten organischen Säuren in Lösung gehalten werden.

Zur Durchführung der NaDodSO_4 -Gelelektrophorese mußte das Protein in 6 M Harnstoff gelöst werden, das Gel wurde mit der gleichen Harnstoffkonzentration hergestellt [Swank & Munkres 1971]. Um eine schnelle Kontrolle der Proteinfractionen zu ermöglichen, wurde mit einer Kammer gearbeitet, in der Gele mit einer Trennstrecke von ca. 4 cm hergestellt werden konnten. Zusätzlich erfolgte das Färben und Entfärben bei erhöhter Temperatur (56°C), so daß nach etwa 3 h bereits eine Aussage über die Trennung und Reinheit der Proteinfractionen möglich war.

3.5. Fragmentierung der δ -Untereinheit

Da die Primärstrukturbestimmung von Molekülen solcher Größenordnung nicht an einem Stück erfolgen kann, mußte zunächst nach geeigneten Fragmentierungsmethoden gesucht werden. Hierbei stehen zwei Überlegungen im Vordergrund. Zum einen sollte die Anzahl und Art der Spaltpeptide so sein, daß sie möglichst vollständig in einem Schritt getrennt und rein dargestellt werden können. Zum zweiten sollten sie für den Abbau am Festphasensequenciator geeignet sein, d.h. optimale Möglichkeiten für die Kopplung bieten. Da sich die δ -Untereinheit in physiologischen Medien nicht lösen läßt, wurden die Möglichkeiten einer enzymatischen Hydrolyse zunächst nicht in Betracht gezogen.

3.5.1. Reduktion und Spaltung mit CNBr

Auf Grund der Aminosäurezusammensetzung (1 Met pro Molekül, s. Tab.8) bot sich zunächst die Spaltung nach Met mit CNBr an (s.Abb.18) [Gross & Witkop 1961]. Hier bietet die Festphasenmethode den zusätzlichen Vorteil, daß bei nicht optimal getrennten Fragmenten die spezifische Lactonkopplung auch aus einem Gemisch heraus erfolgen kann [Rückel & Wachter 1980]. In Vorversuchen wurden 20 nMol Peptid in 0.5 M CNBr in 80% Ameisensäure bei 37 und 56°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Nach Entwicklung der Platten und Anfärben der Peptide ergab sich das in Abb.19 gezeigte Muster. Zum Ende des Versuchs wurde der Rest auf seinen Gehalt an Met bzw. dessen Oxidationsprodukte, Hlc und Hse am Aminosäureanalyator untersucht.

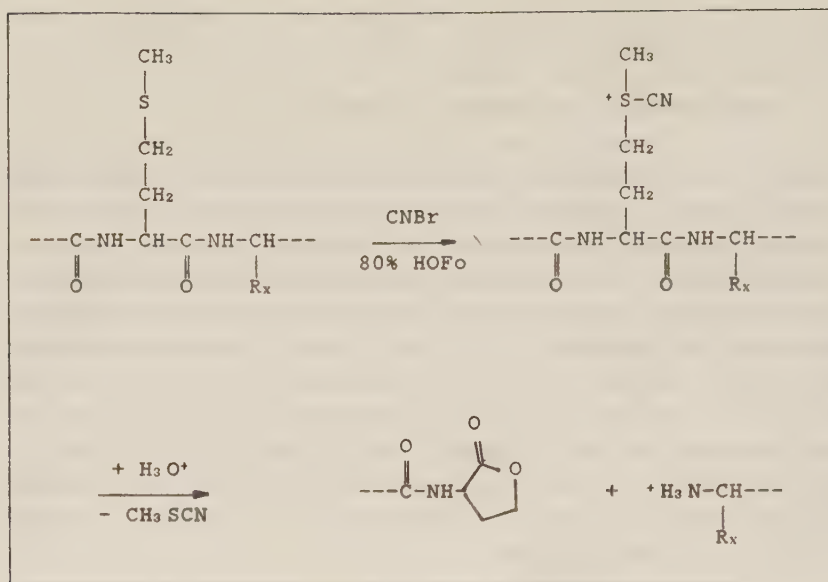


Abb.18 Reaktionsschema der CNBr-Spaltung nach Met

In der Abb.19 erkennt man, daß ein Ende der Reaktion nach etwa 8 h erreicht ist. Eine Erhöhung der Temperatur führt vermehrt zu unspezifischen (acidolytischen) Spaltprodukten, wie aus dem mehr verwaschenen Muster zu erkennen ist. Die Aminosäurenanalyse ergab, daß die Spaltung in beiden Fällen nur zu einem geringen Teil abgelaufen war, bei 37°C enthielt der Spaltansatz ca. 75%, bei 56°C ca. 85% nicht umgesetztes Met.

Da Met im Verlauf der Reinigungsprozedur über das noch reduzierbare Sulfoxid zu Methioninsulfon oxidiert werden kann, lag es nahe, dieses vor der Spaltung wieder in den Thioether umzuwandeln. In Proteinen ist diese Reduktion unter anderem mit NaBH₄, (t-Bu)₃P [Rüegg & Rudinger 1977] und einer Reihe von Thiolderivaten [Savige & Fontana 1977] möglich.

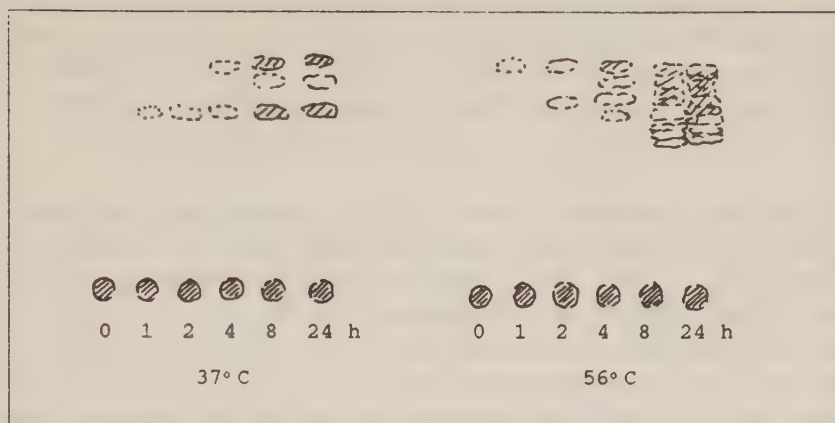


Abb.19 Kinetik der CNBr-Spaltung der δ -Untereinheit mittels Dünnschichtchromatographie

Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ conc = 2/2/1 (v/v/v)

Färbung: s. Material und Methoden

Die Reduktion mit NaBH_4 erfordert einen pH im neutralen Bereich, daher wurde in Vorversuchen eine Suspension des Proteins in 50% Ethanol hergestellt. Die Reaktion wurde für 18 h bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend, wie oben beschrieben, die Kinetik der CNBr-Spaltung auf Dünnschichtplatten verfolgt. Der umgesetzte Anteil an Met bzw. neu entstandenem Hse wurde wiederum am Aminosäureanalysator bestimmt. Aufgrund des hohen Salzgehalts der Lösungen war das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie nicht zu verwerten. Die Aminosäurenanalyse ergab nach 24 h für Hse einen Anteil von 40%, ein Hinweis, daß eine Steigerung der Spaltungsausbeuten durch vorhergehende Reduktion möglich sein sollte. Limitiert ist dieses Verfahren jedoch dadurch, daß nicht in Lösung gearbeitet werden kann.

Eine Reaktion der Sulfoxide mit $(t\text{-Bu})_3\text{P}$ und Propanol-(1) als Lösungsvermittler sollte im alkalischen Milieu durchgeführt werden, bei saurem pH verläuft die Reduktion nur sehr langsam [Rüegg & Rudinger 1977]. Sowohl in einem Pyridin/ H_2O -Puffer

(1/1 v/v) wie auch in einer wäßrigen Triethylaminlösung ließ sich das Protein nicht ausreichend lösen, die entsprechenden Spaltungsausbeuten betrugen 20% bzw. 0% nach Aminosäurenanalyse. Zusätzlich hat dieses Reduktionsmittel den Nachteil einer geringen Stabilität und hohen Toxizität.

Die besten Ergebnisse konnten nach Verwendung von 2-Mercaptoethanol als reduzierendes Agens erzielt werden. Die Reduktion kann hier in 80% Ameisensäure durchgeführt werden, die Ausbeuten der CNBr-Spaltung bewegen sich zwischen 60 und 70%. Die vollständige Entfernung des Reduktionsmittels ist durch Trocknen im Ölpumpenvakuum möglich, als Alternative wurde auch eine Fällung des Proteins und Waschen des Niederschlags mit Methanol oder Ethanol ohne Verluste eingesetzt. Dieses Molekül zeigt zusätzlich eine gewisse Detergentienwirkung, was für den Ablauf der Reaktion einen Vorteil bietet. Bei der Herstellung präparativer Mengen an Spaltpeptiden wurde in der Folge ausschließlich diese Methode angewendet.

Dabei kamen, nach vorheriger Reduktion, 400 bis 900 nMol Peptid in 1 bis 2 ml 80% Ameisensäure 0.5 bis 1 M an CNBr zur Spaltung. Die Reaktionsdauer bewegte sich zwischen 18 und 24 h bei Temperaturen von 20 bis 37°C. Der im Dunklen gehaltene Reaktionsansatz wurde anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt, in einem kleinen Volumen (200 - 400 µl) 80% oder konzentrierter Ameisensäure gelöst und direkt zur Trennung auf eine Säule aufgetragen.

Ein typisches Elutionsmuster ist in der Abb.20 dargestellt, die Separation fand auf der gleichen Säule wie bei der Reinigung der kleinen Untereinheiten statt. Die Charakterisierung der einzelnen Fraktionen erfolgte wiederum durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäure, Dünnschichtchromatographie und Aminosäurenanalyse.

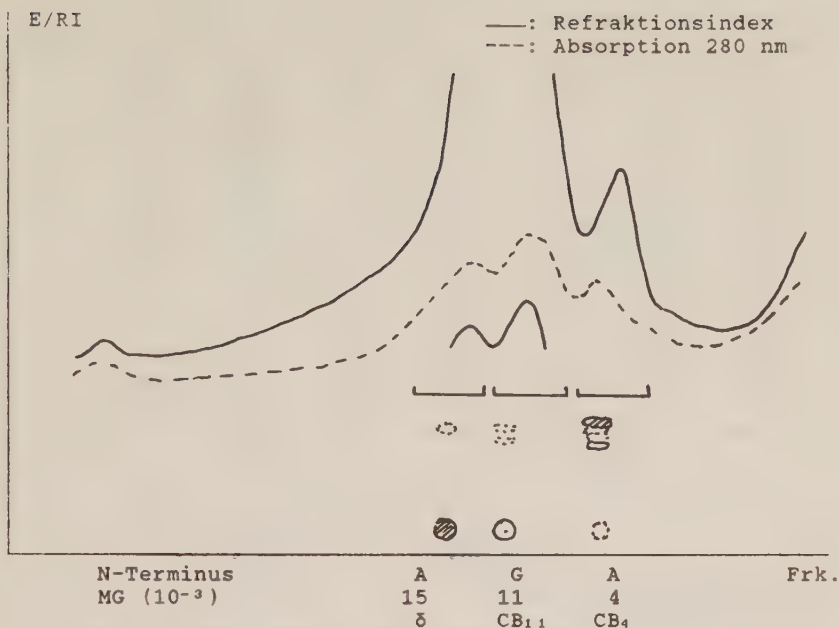


Abb.20 Trennung des CNBr-Spaltansatzes. DC wurde mit dem Laufmittel wie in Abb.19 durchgeführt.

Sephacryl S-200
1.2 x 250 cm
80% HOFo
2.4 ml/h

Die Molekulargewichte der Spaltprodukte betrugen nach einer Vergleichschromatographie eines bekannten Peptidgemisches 15000 (N-Terminus Ala), 11000 (Gly) und 4000 (Ala). Die jeweiligen Aminosäurezusammensetzungen sind in Tab.9 aufgeführt. Aus den Werten der Aminosäurenanalyse, den N-Termini und den Molekulargewichten folgt, daß die δ -Untereinheit ein Met in der Position 35 bis 40 enthält, nach CNBr-Spaltung entstehen daher zwei Peptide, CB_{11} entsprechend dem C-terminalen Anteil und CB_4 , das N-terminale Ende und Hse enthält.

	δ gesamt		CB ₁₁		CB ₄	
Asx	7.6	10.8	7.4	7.8	8.9	3.3
Thr	2.4	3.4	2.2	2.3	2.5	.9
Ser	7.6	10.8	7.5	7.9	7.8	2.9
Hse	-	-	-	-	+	+
Glx	15.1	21.4	17.0	17.8	14.6	5.5
Pro	4.0	5.7	4.2	4.3	4.3	1.6
Gly	8.6	12.2	9.6	10.1	6.9	2.6
Ala	13.1	18.6	12.4	12.9	12.8	4.8
Val	9.7	13.8	9.8	10.2	10.7	4.0
Met	.7	1.0	-	-	-	-
Ile	5.8	8.2	5.6	5.8	6.4	2.4
Leu	9.3	13.1	9.5	9.9	9.3	3.5
Tyr	1.6	2.3	1.2	1.3	2.0	.7
Phe	2.9	4.1	3.0	3.1	1.9	.7
His	1.7	2.4	1.4	1.4	2.1	.8
Lys	6.5	9.2	6.2	6.4	7.0	2.6
Arg	3.4	4.8	3.0	3.2	3.0	1.1
AS	142		105		38	
MW (10 ⁻³)	15		11		4	

Tab.9 Aminosäurezusammensetzung der Reaktionsprodukte nach CNBr-Spaltung

Die Zahlen in der ersten Spalte geben jeweils Mol% an, in der zweiten steht die Aminosäurezusammensetzung bezogen auf die in der letzten Zeile stehenden Molekulargewichte.

3.5.2. Spaltung nach Tyrosin

Als weitere potentielle Fragmentierungsmethode bietet sich die C-terminale Seite des Tyr, das pro Untereinheit in 2 bis 3 Exemplaren vorhanden ist, an. Die Spaltung kann spezifisch mit N-Bromsuccinimid [Ramachandran & Witkop 1967] oder auch mit o-Jodosobenzoessäure [Mahoney & Hermodson 1979] erfolgen. Beide Reagenzien bieten den Vorteil, daß, ähnlich wie bei der CNBr-Spaltung, jeweils Hydroxyderivate der Aminosäuren entstehen, die als Lactone im allgemeinen mit guten Ausbeuten an den festen Träger gebunden werden können [Wachter & Werhahn 1979, 1980] (s. Abb. 6 und 21).

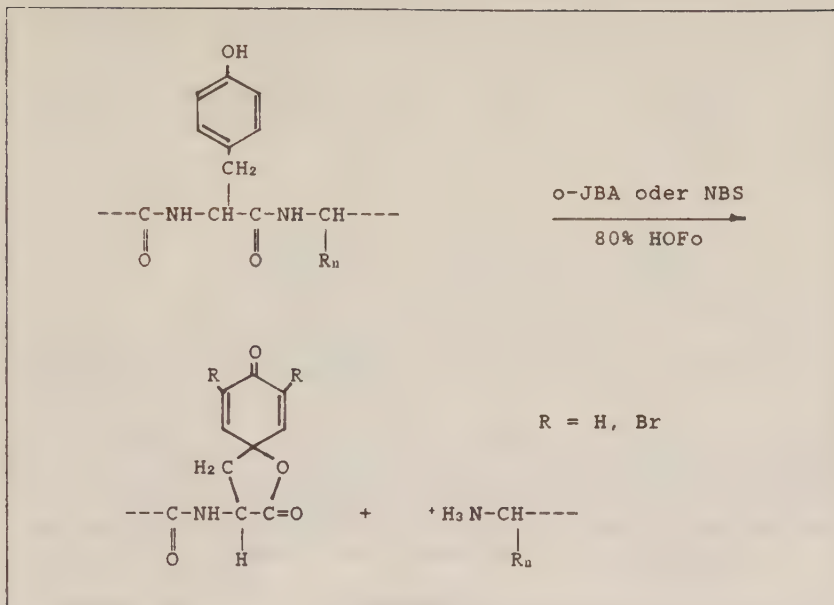


Abb.21 Reaktionsschema der Spaltung nach Tyr mit o-JBA oder NBS

Zunächst wurden in einem Experiment diese beiden Substanzen miteinander verglichen. Dafür wurden jeweils 20 nMol δ -Untereinheit in 80% Ameisensäure mit 6 μ Mol NBS bzw. oJBA bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Wie bereits oben beschrieben, wurde auch hier der Verlauf der Reaktionen auf Dünnschichtplatte festgehalten; das Ergebnis ist in Abb.22 gezeigt. Hierbei zeigte es sich bei beiden verwendeten Laufmitteln, daß der vollständigere Umsatz mit NBS zu erreichen ist.

Die Spaltung eines größeren Ansatzes (400 nMol Protein mit NBS bei 37°C für 4 h) und dessen säulenchromatographische Trennung ist in Abb.23 dargestellt. Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren wie auch die Analyse der einzelnen

Fraktionen durch Dünnschichtchromatographie bestätigten die unvollständige Trennung der offenbar zahlreichen Fragmente.

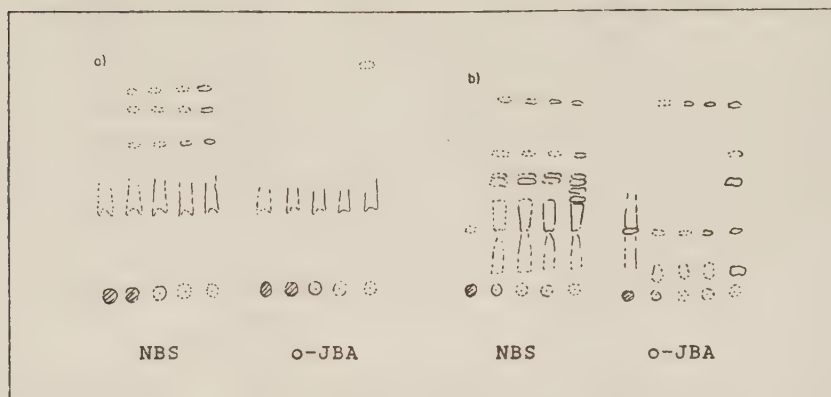


Abb.22 Kinetik der Spaltung nach Tyr mit o-JBA bzw.NBS. Zeitpunkte des Auftragens waren jeweils 0, 10, 30 min, 1 und 18 h.

Laufmittel a: n-BuOH/H₂O/HOAc = 35/10/5

Laufmittel b: n-BuOH/Pyridin/H₂O/HOAc = 90/60/72/18
jeweils Volumenteile

Eine theoretische Überlegung zeigt, daß bei N potentiellen Spaltstellen und unvollständiger Spaltung (<1 bzw. $<100\%$) insgesamt $(N^2 + 3N + 2)/2$ Fragmente einschließlich des ungespaltenen Stückes auftreten können (s.Abb.24). In diesem Fall bedeutet dies das Entstehen von 6 (2 Tyr) bzw. 10 (3 Tyr) Peptiden. Aus diesem Grund wurde zunächst die Spaltung mit CNBr nach Met angewandt, da sich hier der bessere Zugang zu verwendbaren Peptiden bot.

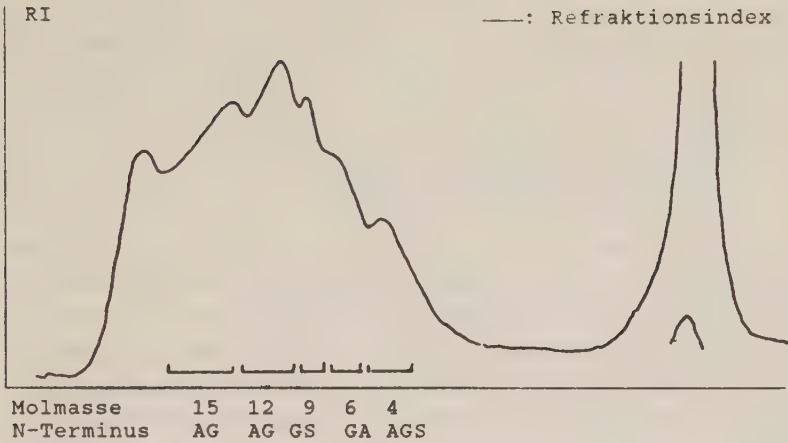


Abb.23 Trennung der Spaltpeptide nach Reaktion mit NBS. Die gefundenen N-terminalen Aminosäuren sind mit ihrer Einbuchstabenabkürzung angegeben, die Zahlen geben die errechneten Molmassen/ 10^3 an.

TSK HW-50(I)
 0.6 x 150 cm
 80% HOFO
 .75 ml/h

A	B	C	A	B	C	D
+	+	+	+	+	+	+
x		y	x	y	z	
A = x P B = x y P C = y P AB = (1-x) y P BC = x (1-y) P ABC = (1-x) (1-y) P			A = x P B = x y P C = y z P D = z P AB = (1-x) y P BC = x (1-y) z P CD = y (1-z) P ABC = (1-x) (1-y) z P BCD = x (1-y) (1-z) P ABCD = (1-x) (1-y) (1-z) P			
A, B, C, D, AB, BC, ... Anteil der entstandenen Fragmente x, y, z Spaltungsausbeute (1 = 100%) P Ausgangsmenge						

Abb.24 Zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit, mit der bei Spaltungen Fragmentpeptide entstehen

3.6. Sequenz des CNBr-Peptids CB₄

3.6.1. Edman-Abbau des gesamten Peptids

Von den ersten zehn Positionen waren bereits acht in einem früheren Versuch bestimmt worden (s. Abb. 17, Ala-Glu-Ala-Val-Ala-?-Lys-Ile-?-Leu). Es bot sich an, zunächst das gesamte Peptid über sein C-terminales Hse an den Träger zu koppeln und dieses schrittweise abzubauen. Die Kopplung wurde nach Lactonisierung in wasserfreier TFA in üblicher Weise durchgeführt (s. Material und Methoden), am Ende der Reaktion wurde der Überstand abpipettiert, der Träger dreimal mit TFA gewaschen und die Waschflüssigkeit mit dem Überstand vereinigt. Eine quantitative Untersuchung dieses Teils ergab, daß das Peptid vollständig gekoppelt war. Der beladene Träger wurde einige Male mit Methanol gewaschen und schließlich im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Nach Abbau am Festphasensequencer erfolgte die Detektion der PTHs durch Massenspektrometrie, Gaschromatographie und HPLC. Eine quantitative Auswertung der erhaltenen Daten wurde nach der Arbeit von Smithies, Gibson et al. [1971] durchgeführt.

Bei dieser Methode werden zunächst die jeweiligen Ausbeuten an PTHs gegen die Abbauschritte aufgetragen. Anschließend bestimmt man mittels entsprechender Werte den Untergrund in jeder Kurve, dieser kann mit einer Funktion berechnet und von den aktuellen Werten subtrahiert werden. Dem schließt sich eine vorläufige Bestimmung der repetitiven Ausbeute Θ an.

$$R_n = R_0 \Theta^n \text{ bzw. } \ln R_n = \ln R_0 + n \ln \Theta$$

R_n = Ausbeute an PTH im Schritt n

R_0 = Startmenge an Protein

Θ = repetitive Ausbeute

Zur Berechnung von Θ wählt man die entsprechenden Maxima in den jeweiligen Kurven und mittelt die so erhaltenen Werte. Da die Reaktionsausbeuten pro Abbauzyklus stets kleiner als 100% sind ($\Theta < 1.0$), resultiert bei zunehmender Länge des Abbaus ein "Nachhinken" der Sequenz. Gemäß einer theoretischen Überlegung beträgt dieser Anteil beim Schritt n:

$$R_{n+1} = R_0 \Theta^n (1-\Theta) n$$

R_{n+1} ist der Anteil an N-Termini des Schrittes n, der bei n+1 noch zur Reaktion kommt, $1-\Theta$ entspricht dem Teil der Aminosäuren, die im Schritt n nicht reagiert haben. In der Praxis ist von diesen allerdings nur ein Teil zugänglich, der Rest wird durch Nebenreaktionen (z.B. Oxidation?) im vorhergehenden Zyklus irreversibel blockiert. Der tatsächliche Anteil an "nachhinkenden" PTHs wird daher besser durch

$$R_{n+1} = R_0 \Theta^n \Omega n$$

beschrieben. Mit Ω wird der sogenannte "overlap" bezeichnet. Bildet man den Quotienten der PTH-Ausbeuten bei Schritt n+1 und n, erhält man:

$$R_{n+1}/R_n = n \Omega$$

Zur Bestimmung von Ω wählt man geeignete Maxima und den jeweils nachfolgenden Wert, bildet den oben beschriebenen Quotienten und führt einen linearen Ausgleich durch. Mit der so erhaltenen Funktion können nun die Ausbeuten an PTH so korrigiert werden, daß man die mit Ω berechneten Werte von Schritt n+1 subtrahiert und zum Schritt n addiert. Zuletzt wird in der oben zitierten Arbeit [Smithies et al. 1971] die endgültige repetitive Ausbeute mit den korrigierten Werten bestimmt.

Bei dem Versuch, dieses Verfahren auf die hier eingesetzten Methoden anzuwenden, stößt man auf Schwierigkeiten. Zum einen sind die durch das Massenspektrometer erhaltenen Daten, die

sich für eine quantitative Auswertung anbieten, für die einzelnen Aminosäuren auf Grund ihrer unterschiedlichen Transmission (z.B. wird Ala-PTH in größerer Menge detektiert als Lys-PTH, Ser-PTH kann nur als dehydratisiertes Fragment nachgewiesen werden, usw.) zu verschiedenen, als daß man sie direkt vergleichen könnte. Somit mußten die Abbaukurven der jeweiligen Aminosäuren auf den gleichen Bereich gestreckt werden, das heißt, der Maßstab wurde so gewählt, daß der größte und der kleinste Wert in den einzelnen Kurven identisch war.

In Abb.25 sind die Abbaukurven einiger Aminosäuren (HPLC und Massenspektrometer) aus der Sequenzierung des gesamten CB₄ gezeigt. Auf der linken Seite sind jeweils die Diagramme nach Auftragen der ursprünglichen Daten und Angleichung des Maßstabes zu sehen. Dabei zeigt sich, daß die in [Smithies et al. 1971] angegebene Formel zur Berechnung des Untergrundes hier nicht angewendet werden kann. Das mag daran liegen, daß dieser sich beim Vergleich zwischen Fest- und Flüssigphasensequenzator grundsätzlich verschieden verhält. Zusätzlich treten beim diskontinuierlichen Arbeiten (während der Nacht abgebaute Thiazolinone werden erst am darauf folgenden Tag aufgearbeitet) Brüche im Untergrund auf (s. Abb.25 zwischen Schritt 21 und 22), die es erforderlich machen, diesen auch abschnittsweise berechnen zu können. Dabei wurde so verfahren, daß repräsentative Punkte für die Bestimmung ausgewählt wurden (Abb.25.1, 7-17, 20-21, 22-31, 34), und für diese, wenn nötig in mehreren Abschnitten (Abb.25, Neuberechnung ab 22), eine lineare oder logarithmische Ausgleichskurve berechnet und dann von den ursprünglichen Werten abgezogen wurden.

Abb.25 (S.97 - 100) Edman-Abbau des gesamten CB₄

Die linke Spalte zeigt jeweils die ursprünglichen Daten auf den gleichen Bereich gedehnt, in der rechten sind die Kurvenverläufe nach den im Text und in [Smithies et al. 1971] beschriebenen Korrekturen zu sehen. Die Aminosäure-PTHs sind mit ihren Einbuchstabenabkürzungen angegeben, die Zahlen geben die Molmassen bei der Detektion im Massenspektrometer an.



Abb.25.1 bis 25.8 Edman-Abbau des gesamten CB₄

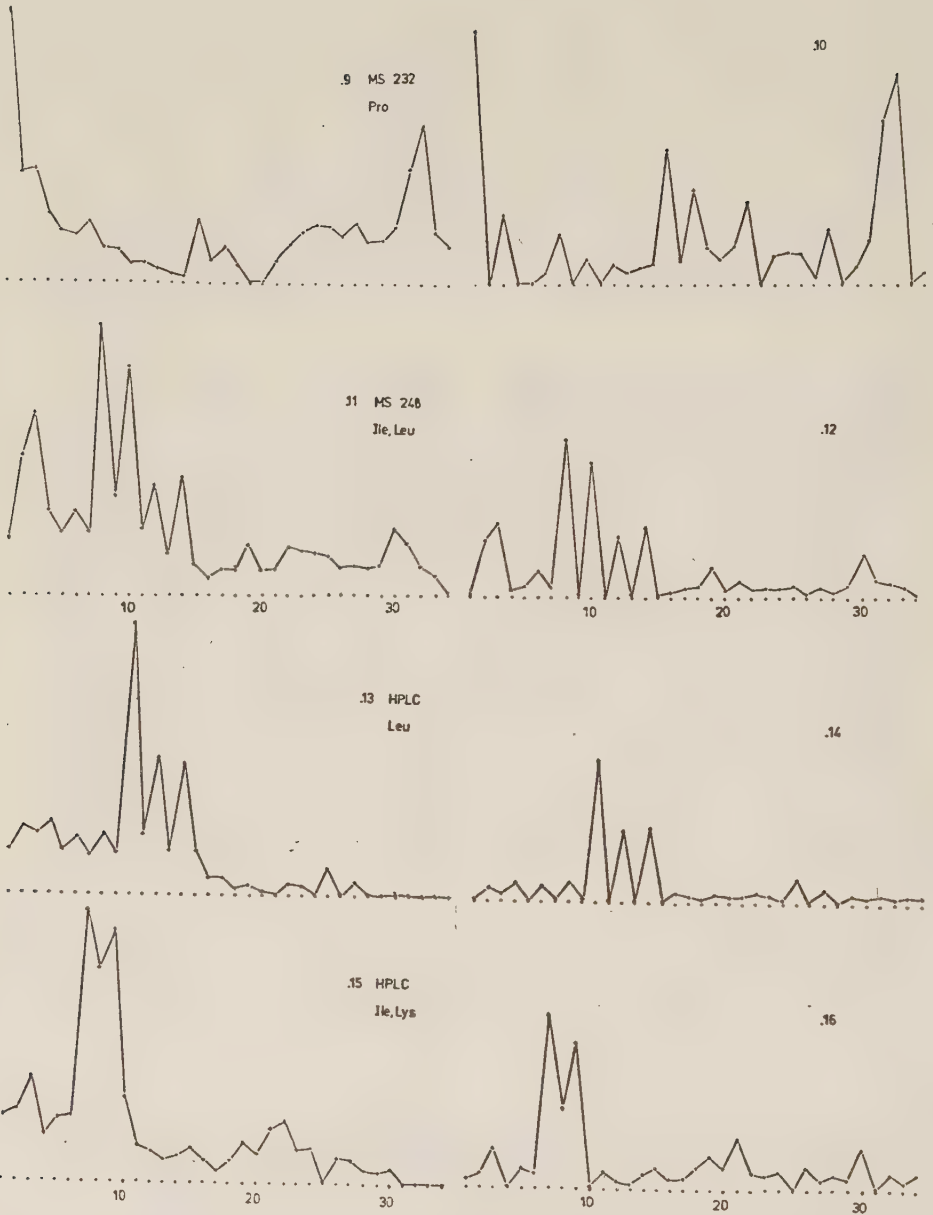
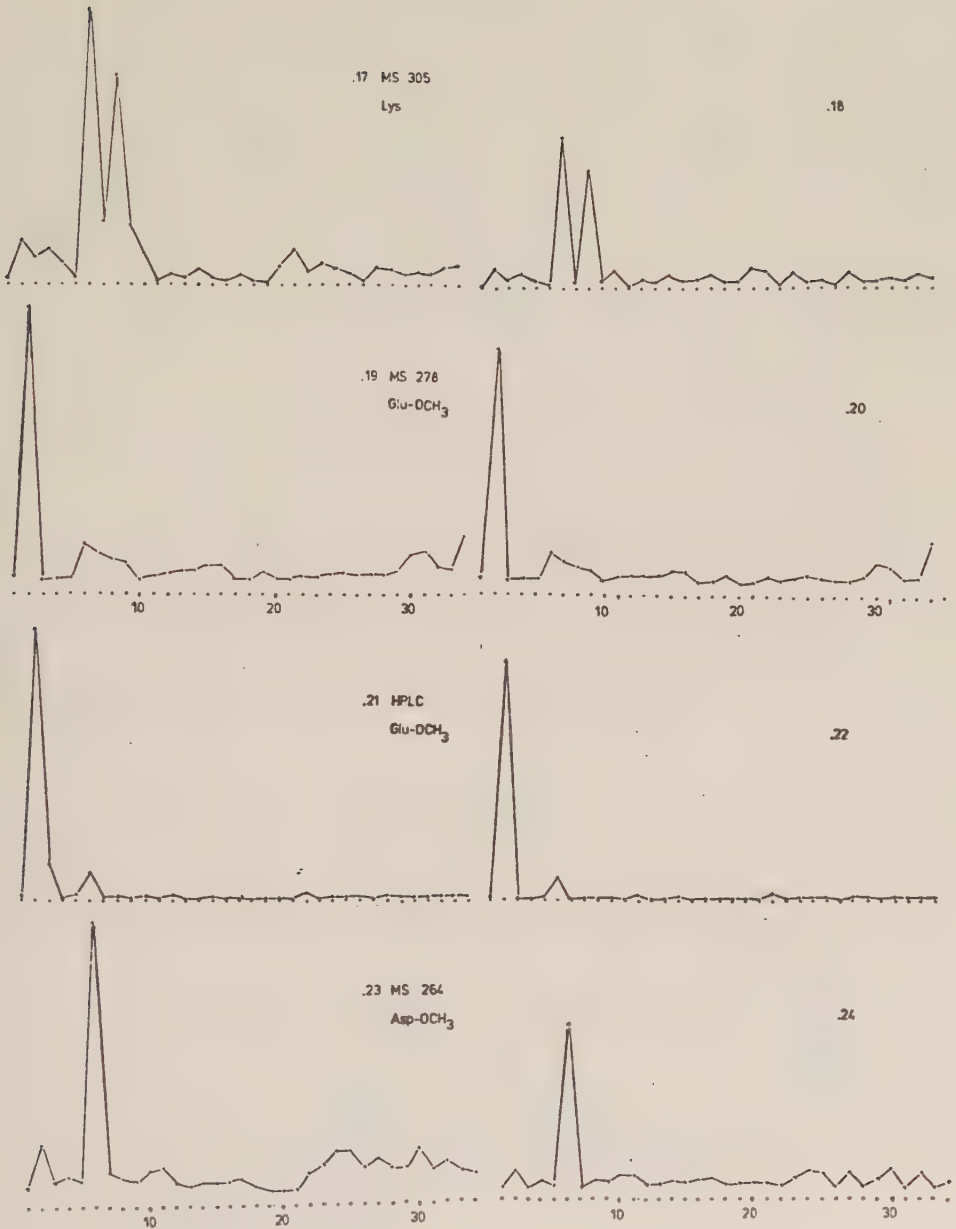


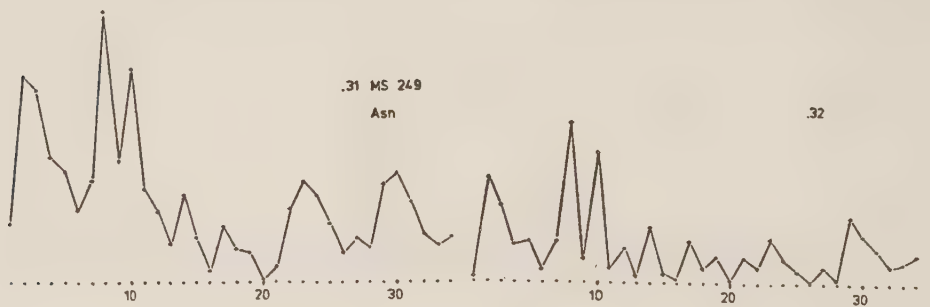
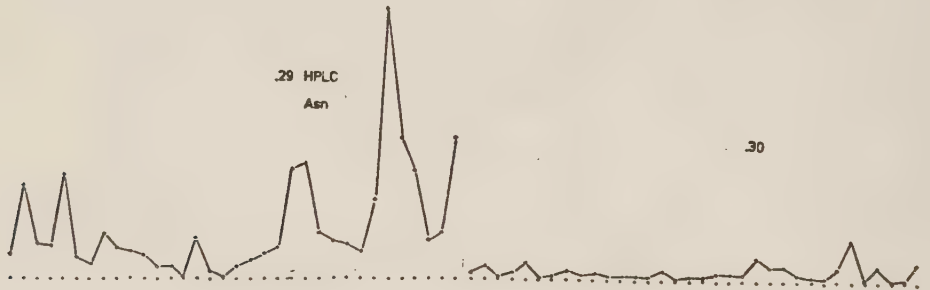
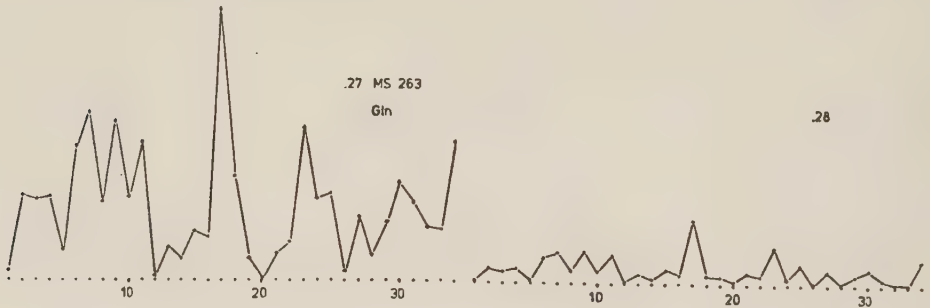
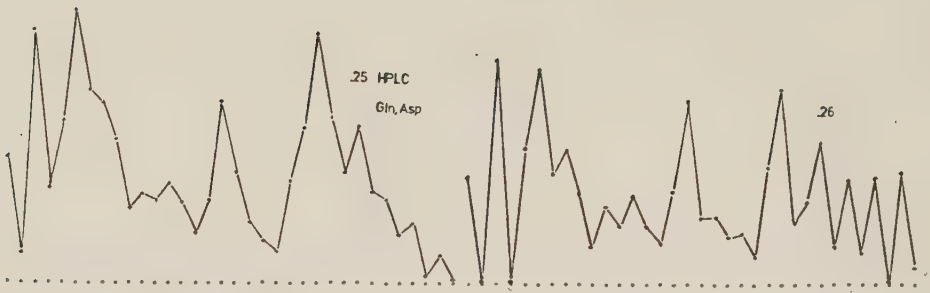
Abb. 25.9 bis 25.16 Edman-Abbau des gesamten CB₄

Schritte



Schritte

Abb.25.17 bis 25.24 Edman-Abbau des gesamten CB₄

Abb. 25.25 bis 25.32 Edman-Abbau des gesamten CB₄

Schritte

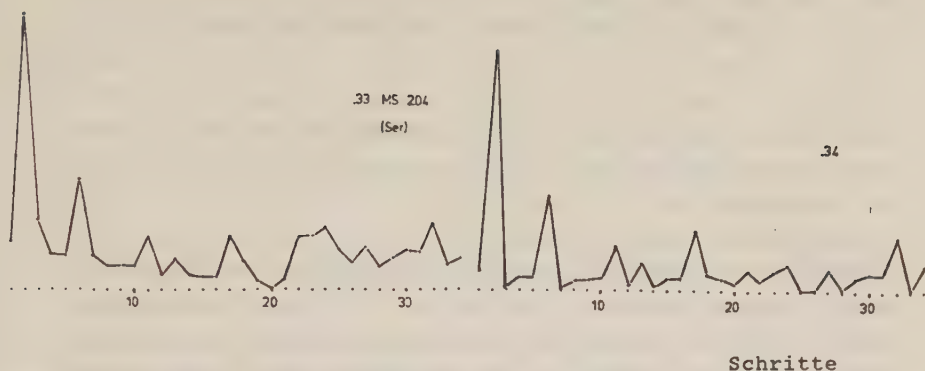


Abb.25.33 und 25.34 Edman-Abbau des gesamten CB₄

Am Beispiel der Abb.25.1 (MM 206, Ala-PTH) wurde durch Vergleich der Korrelationskoeffizienten der Bereich von 1 bis 21 mit einer logarithmischen, der von 22 bis 34 mit einer linearen Funktion ausgeglichen. Für eine effiziente Auswertung der Sequenzdaten sollte somit kontinuierliches Arbeiten im sogenannten "on-line"-Betrieb angestrebt werden [s. z.B. Machleidt & Hofner 1981].

Zur Berechnung des vorläufigen Wertes für die repetitive Ausbeute Θ wurden deutlich erkennbare Maxima gewählt (z.B. Abb.25.1 1, 3, 5, 18 und 32), für die jeweiligen Kurven einzeln berechnet und zum Schluß der Mittelwert gebildet ($\Theta = .942$ bei dem in Abb.25 gezeigten Abbau). Die Bestimmung von Ω (Anteil der "nachhinkenden" PTHs) erfolgte ebenfalls mit eindeutigen Maximalwerten und dem nachfolgenden Schritt (z.B. Abb.25.1 2/1, 4/3, 6/5, 19/18 und 33/32). Als Mittelwert ergab sich hier $\Omega = .011$. Nach entsprechender Subtraktion und Addition des mit Ω berechneten "Nachhinken" der Sequenz und eine erneute Bestimmung von Θ mit Angleichung der Kurven auf diesen Mittelwert wurden die in der rechten Spalte der Abb.25 gezeigten Diagramme erhalten.

Als Sequenz dieses Abbaus ergab sich zusammen mit den nicht gezeigten Daten aus der Gaschromatographie folgende:

1	5	10	15
Ala-Glu-Ala-Val-Ala-Asp-Lys-Ile-Lys-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Pro-			
? -Gln-Ala-Ile-Tyr-Lys- ? -Gln-Asp-Val-Val-Gln-Val-Asn-Ile-			
? -Ala-Val- ? - ? -			

Die Positionen von Ala ergeben sich eindeutig aus dem Verlauf der MS-Daten (Abb.25.2 MM = 206). Die Bestätigung erfolgt durch die Kurve nach HPLC (Abb.25.4, Ala und Tyr). Ala im Schritt 32 zeigt sich in beiden Kurven als Maximum, allerdings trifft das auch für andere zu (Abb.25.10, .16, .24 und .34), so daß dieser Wert als nicht gesichert angesehen werden muß. Als sicher ist dagegen die Position von Tyr in Schritt 20 anzunehmen (Abb.25.4). Für Val zeigen die Daten nach Massenspektrometer (Abb.25.6) und HPLC (Abb.25.8) bis einschließlich Schritt 28 eindeutige Ergebnisse, die Position 33 ist wiederum als fraglich zu bewerten. Der zusätzlich in Abb.25.8 auftretende Gipfel bei 15 ist zusammen mit Abb.25.10 Pro zuzuordnen. Die in dieser Kurve ebenfalls auftretenden Maxima bei 1, 17, 21 und 27 korrelieren weder mit den HPLC- noch den hier nicht gezeigten Gaschromatographiedaten. Die Gipfel bei 31 und 32 lassen lediglich die Vermutung für Pro in Schritt 31 zu. (s. auch Abb.25.8). Für die Interpretation der Kurve in Abb.25.12 sind auf jeden Fall zusätzliche Informationen erforderlich, da Ile und Leu die gleiche Molekularmasse besitzen (MM=248). Nimmt man die HPLC-Daten aus Abb. 25.14 dazu, ergeben sich für Leu die Positionen 10, 12 und 14, während in den Schritten 19 und 30 Ile auftritt (s. auch Abb.25.16). Auch hier erfolgte eine zusätzliche Bestätigung durch den Gaschromatographen. Die weiteren Gipfel in Abb. 25.16 können dann zusammen mit 20.18 eindeutig Lys zugeteilt werden. Die Platzierung der sauren Aminosäuren, Glu und Asp, die als Methylester detektiert werden, geht aus Abb.25.20 und .24 hervor. Die Bestätigung für Glu zeigt die Kurve in Abb. 25.22, wohingegen die Situation bei Asp (Abb.25.26) weniger eindeutig ist. Hier war die zusätzliche Information durch

Gaschromatographie notwendig. Die Positionen für Gln sind bei einem Vergleich zwischen Abb.25.26 und .28 erkennbar, Schritt 25 fällt dabei aus, weil er zwar im MS (Abb.25.28), nicht aber im HPLC (Abb.25.26) einen Gipfel zeigt. Asn in Schritt 29 ist in Abb.25.30 eindeutig festgelegt, bei der Bestätigung durch das MS muß hier berücksichtigt werden, daß sowohl ein Fragment von Lys-PTH wie auch ein Isotopengipfel von 248 (Ile- oder Leu-PTH) zusätzlich bei der Masse 249 erscheinen können. Ser-PTH wird sowohl am Gaschromatographen wie auch am Massenspektrometer stark fragmentiert, so daß der sichere Nachweis nur bei ausreichender Menge gelingt. Weiterhin wird das durch Abspaltung von Wasser entstandene Bruchstück mit der Molmasse 204 im MS auch von den sauren Aminosäuren, bzw. deren Amide gebildet. Schließt man diese Positionen (2, 6, 17, 23, 24 und 27) aus, so verbleiben in der Abb.25.34 als in Frage kommende Maxima 11, 13 und 32, wobei letzteres aus den oben bei Ala angeführten Gründen als unsicher ausscheiden muß.

Mit diesem Ergebnis war das weitere Vorgehen festgelegt. Das Bromcyanpeptid CB₄ mußte weiter fragmentiert werden, um

- a) die fraglichen Positionen durch Sequenzieren geeigneter Bruchstücke zu sichern und
- b) die restliche Primärstruktur bis zum C-terminalen Hse (nach Aminosäurenanalyse noch weitere ca. 5 Positionen nach Val³³) festzulegen.

3.6.2. Spaltung von CB_4 und Sequenz der Peptide

3.6.2.1. Spaltung mit Trypsin

Da sich das Peptid CB_4 nach Zusatz von geringen Mengen Pyridin/ H_2O (v/v = 1/1) als gut löslich in NH_4HCO_3 -Puffer erwies, wurde zunächst eine enzymatische Spaltung mit Trypsin durchgeführt. Zum Einsatz kamen 100 bis 400 nMol CNBr-Peptid, die nach Erwärmung im oben beschriebenen Puffer (bis $56^\circ C$) gut in Lösung gingen (pH zwischen 8.0 und 9.0). Die Umsetzung mit Trypsin erfolgte in einem molaren Verhältnis von 1/100 bei $37^\circ C$ für 30 min. Anschließend wurde die gleiche Menge Enzym noch einmal für 1/2 h bei gleicher Temperatur zugesetzt. Eine auf Dünnschichtplatten festgehaltene Kinetik ist in Abb.26 dargestellt.

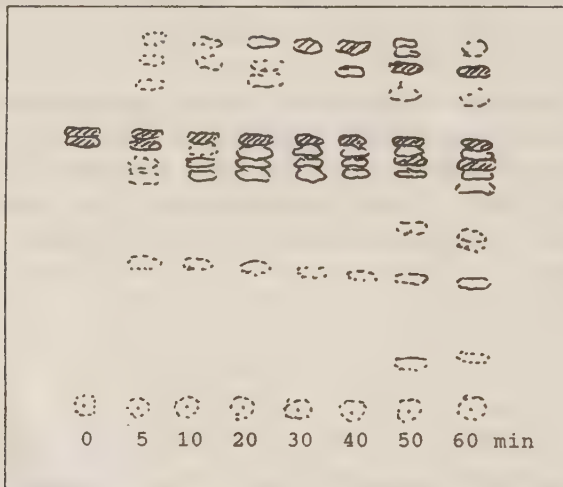


Abb.26 Kinetik der tryptischen Spaltung von CB_4 mittels Dünnschichtchromatographie

Laufmittel: $CHCl_3/CH_3OH/NH_3$ conc = 2/2/1 (v/v/v)

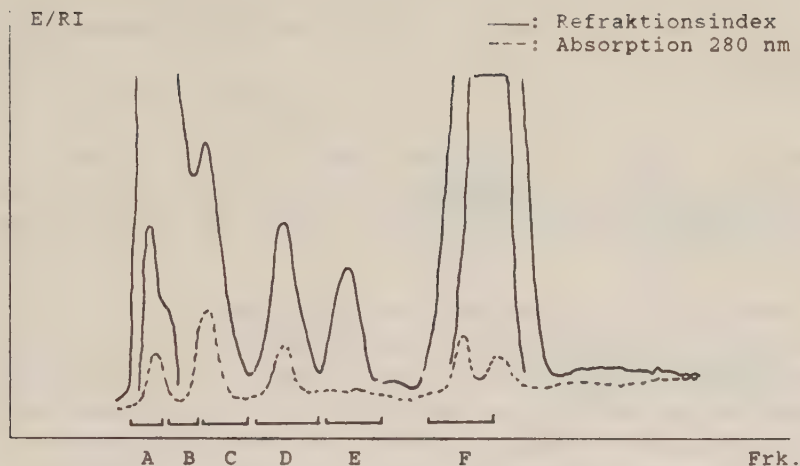


Abb.27 Trennung des tryptischen Spaltansatzes von CB₄

Biogel P-6 200-400 mesh
 1.0 x 150 cm
 10% HOAc
 1.7 ml/h

Zur Trennung des Spaltansatzes wurden zunächst kleinporige Molekülsiebe verwendet; ein Beispiel mit Biogel P-6 zeigt die Abb.27. Sowohl die Aminosäurenanalysen wie auch die Bestimmung der N-Termini ergaben, daß die Trennung im Bereich der Gipfel A bis E nicht vollständig war (s.Abb.27). Einzig der Gipfel in F konnte eindeutig dem zu erwartenden Dipeptid Ile⁸-Lys⁹ zugeordnet werden. Nach der bisher ermittelten Sequenz sollten in E die Peptide Ala¹-Lys⁷ (MM ca. 700) bzw. Ala¹-Lys⁹ (MM ca. 960) zu finden sein. Der zusätzliche N-Terminus Leu (schwächer als Ala nach Dansylierung) wäre dem 12 Aminosäuren langen Fragment Leu¹⁰-Lys²¹ zuzuordnen. Eine Kopplung via Aminogruppen (s. Material und Methoden) der gesamten Fraktion E und der anschließende Abbau ergab als Hauptsequenz Ala¹-Glu-Ala-Val-Ala-Asp-Lys⁷. Sowohl Fraktion D wie auch C enthielten laut Aminosäurenanalyse Hse, d.h. in ihnen mußten das C-terminale Peptid ab Pos.22 oder ein Lys-haltiges ab Leu¹⁰ verborgen sein. Folglich wurden beide

Fraktionen nach dem Schema der Lactonkopplung an den festen Träger fixiert, um selektiv die Hse-haltigen Fragmente zu isolieren.

3.6.2.2. Sequenz der Spaltpeptide mit noch unbekannter Primärstruktur

Der Abbau des aus C erhaltenen Teilstücks ergab die erwartete Folge Leu^{10} -Ser-Leu-?-Leu-?, allerdings gelang es wegen beträchtlicher Inhomogenität nicht, diesen Abbau weiter zu führen. Etwas günstiger war die Situation bei der Analyse des zweiten Fragments (Gipfel D, s.Abb.27). Da sich nach den ersten Schritten herausstellte, daß die tatsächliche Initialausbeute sicher weniger als 10 nMol waren, wurde hier zur Detektion der PTHs nur die HPLC eingesetzt. Als Sequenz ergab sich (s.Abb.28)

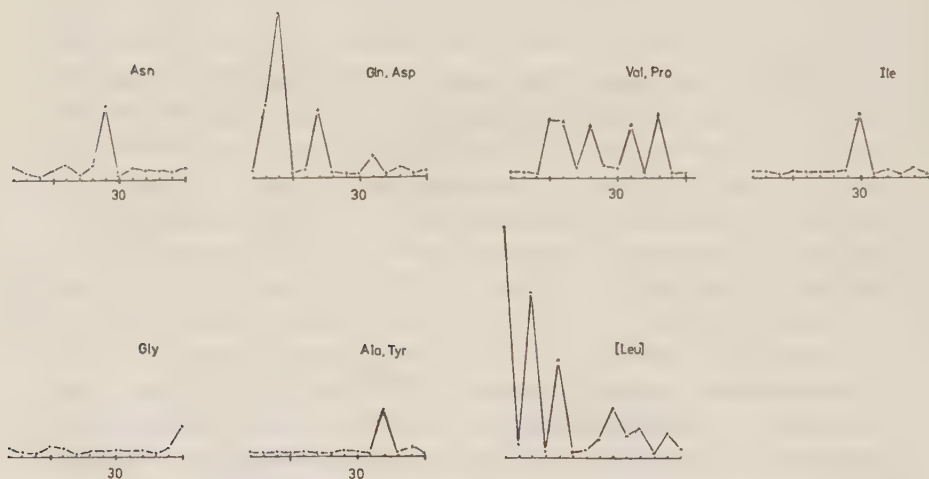


Abb.28 Edman-Abbau der Fraktion D Abb.27

Gezeigt sind die bereits korrigierten Ausbeuten an PTH pro Abbauschritt nach HPLC

22 25 30 35
 ? -Gln-Asp-Val-Val-Gln-Val-Asn-Ile-V/P-Ala-Val- ? -Gly- ? -

wobei Gly in Schritt 35 mit Vorbehalten (s. oben) anzusehen ist. Zumindest konnten die Positionen 32 (Ala) und 33 (Val) gesichert und Aminosäure 31 auf Val oder Pro eingeschränkt werden.

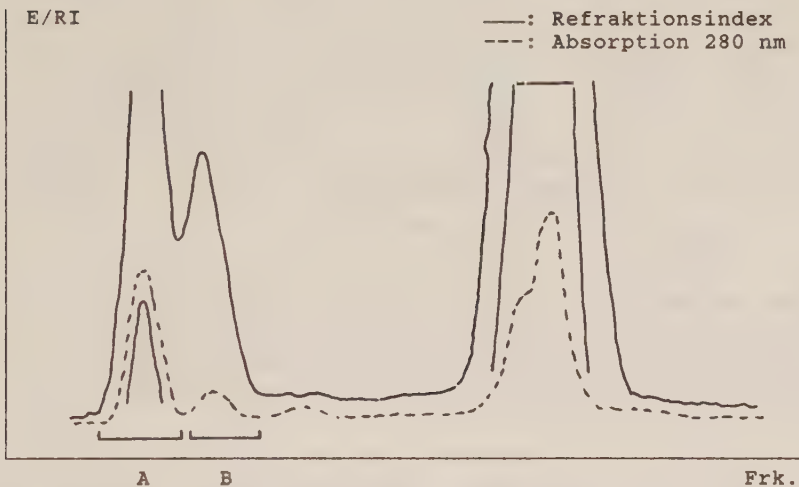


Abb.29 Vortrennung eines tryptischen Spaltansatzes von CB₄. Die weitere Auftrennung der Fraktionen A und B s.Abb.30

Biogel P-2
 1.2 x 150 cm
 10% HOAc
 2.4 ml/h

Bei einem weiteren, mengenmäßig größeren Ansatz wurde nach tryptischer Spaltung eine Vorfraktionierung auf Biogel P-2 vorgenommen (s.Abb.29). Der Hauptgipfel A dieses Säulenlaufs wurde anschließend auf Biogel P-10 aufgetrennt (s.Abb.30a), während B in einem basischen Puffer an einem Polydexrangel

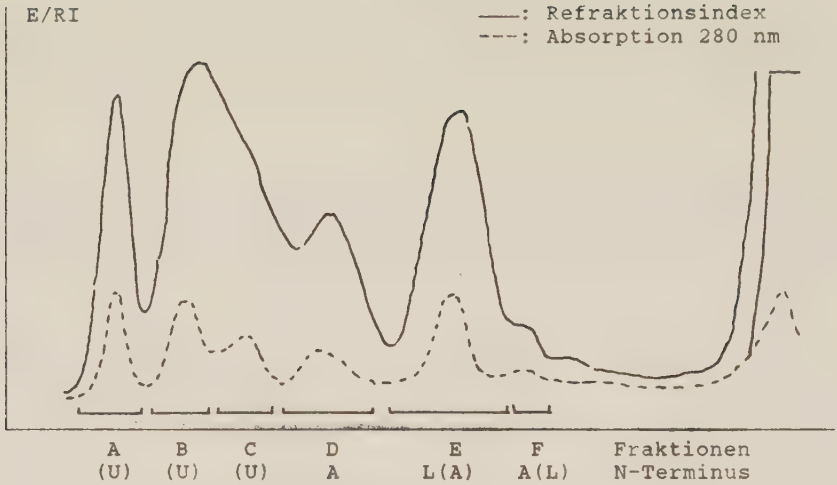


Abb.30a Auftrennung des Gipfels A aus der Abb.29 (Vortrennung der tryptischen Peptide von CB_4)

Biogel P-10 200-400 mesh
0.8 x 150 cm
30% HOFo
1.4 ml/h

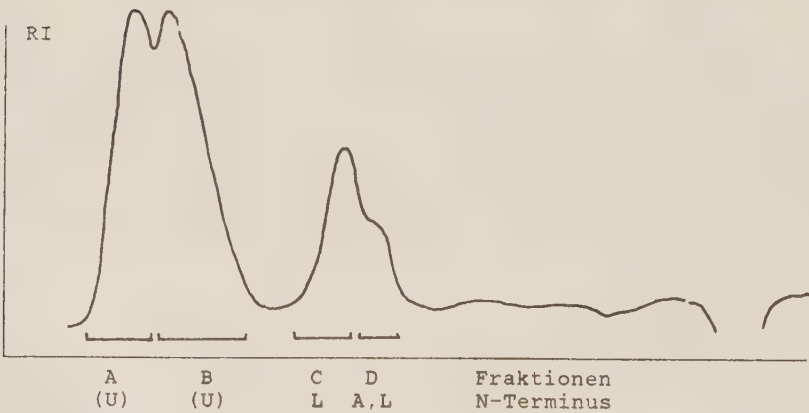


Abb.30b Auftrennung des Gipfels B aus Abb.29

Sephadex G 15
0.7 x 150 cm
0.1 M NH_4HCO_3
1.2 ml/h

30a						30b			
	D		E		F		C	D	
Asx	7.7	3.0	7.9	2.3	211.4		167.7	11.4	
Thr	1.8	.7	1.6	-	122.2		31.2	1.9	-
Ser	10.0	3.8	11.7	3.4	178.8		195.0	4.4	-
Hse	2.2	.9	3.7	1.1	-		78.0	-	-
Glx	15.7	6.0	14.6	4.2	232.7		226.2	13.5	1.3
Pro	5.3	2.0	6.0	1.7	54.2		62.4	2.2	-
Gly	9.1	3.5	7.0	2.0	187.0		113.1	4.2	-
Ala	10.4	4.0	9.2	2.6	238.3		159.9	26.6	2.6
Val	10.8	4.2	12.7	3.7	199.5		198.9	11.0	1.1
Ile	5.3	2.0	6.0	1.7	115.0		109.2	8.8	.9
Leu	8.6	3.3	9.9	2.9	162.2		93.6	3.2	-
Tyr	1.4	.5	1.4	-	41.5		-	.8	-
Phe	2.1	.8	-	-	37.3		-	.8	-
His	2.7	1.0	3.9	1.1	63.2		50.7	.9	-
Lys	5.6	2.2	4.5	1.3	125.0		78.0	10.0	1.0
Arg	1.0	-	-	-	55.7		-	-	-
AS	38		28						8
MM	4.0		3.0						.9
(10 ⁻³)									

Tab.10 Aminosäurenanalysen der Fraktionen aus Abb.30a und b, für 30a F und 30b C ist der Gesamtgehalt in nMol angegeben, bei den anderen Fraktionen zeigt die erste Spalte jeweils Mol%, die zweite die Aminosäurezusammensetzung bezogen auf die unten stehende Molmasse.

fraktioniert wurde (Abb.30b). Die zugehörigen Aminosäurenanalysen sind in Tab.10 aufgelistet.

Die Fraktion D aus der Abb.30a konnte nach N-Terminus und Aminosäurenanalyse als ungespaltenes CB₄ identifiziert werden. Obwohl entsprechende Mengen für die Analyse eingesetzt wurden, konnte in A bis C praktisch kein Protein nachgewiesen werden, das gleiche gilt für A und B in 30b. Gipfel E der Abb.30a mußte auf Grund der Größe (MM ca. 3000), sowie Aminosäurezusammensetzung und N-Terminus (Leu) in der Hauptsache das Bruchstück ab Leu¹⁰ bis zum Hse enthalten. Ein Vergleich der Aminosäurenanalyse mit der bisher bekannten Sequenz ergab, daß neben dem zu erwartenden Hse noch folgende Amino-

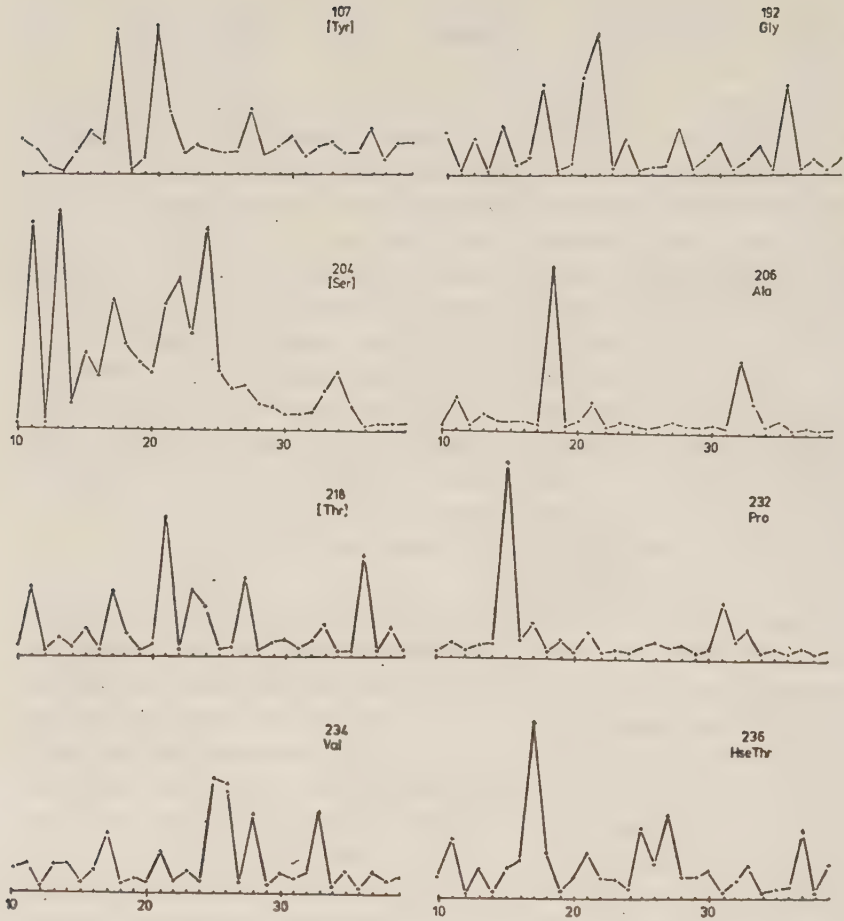
säuren auftreten sollten: 1-2 Ser, 1 Glx, 1 Pro, 2 Gly, 0-1 Ala und 1 His. Da die Menge mit 120 nMol feststand, wurde diese Fraktion komplett über Hse an Aminopropylglas gekoppelt.



Abb.31 Edman Abbau der Fraktion D aus Abb.30b
Gezeigt sind die ursprünglichen Ausbeuten an PTH pro Abbauschritt nach HPLC; die Aminosäuren sind mit der jeweiligen Einbuchstabenabkürzung angegeben.

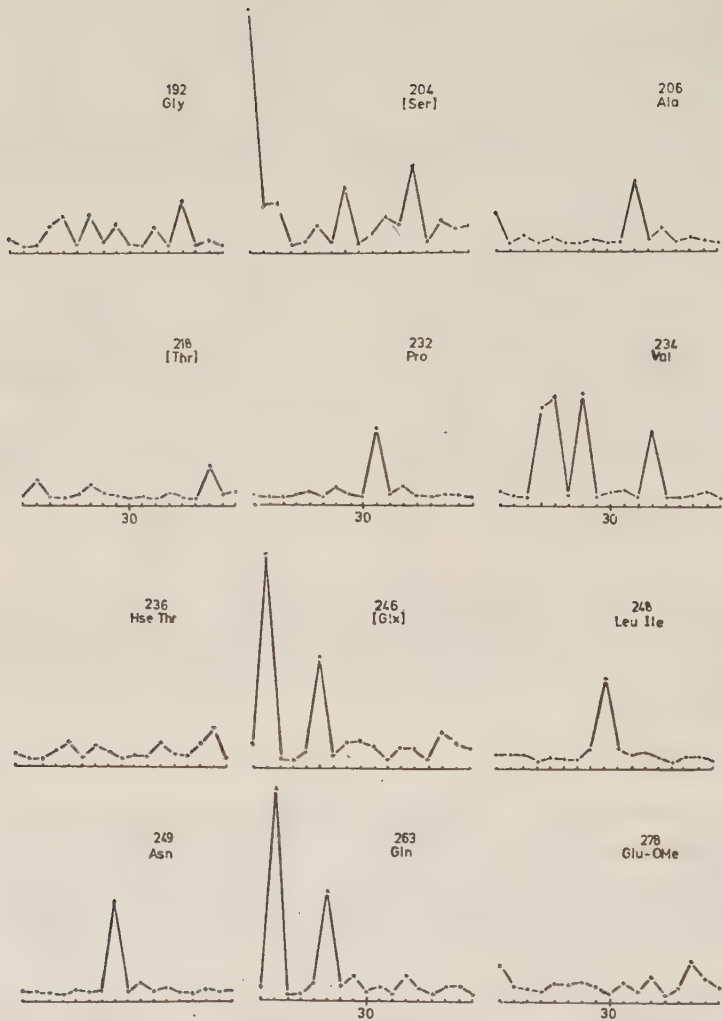
Für den Gipfel F sind in der Tab.10 die insgesamt erhaltenen Mengen an Aminosäuren angegeben, hier liegt offenbar ein Gemisch aus mehreren Peptiden vor. Auch die Fraktion C der Abb.30b enthält eine Mischung, doch ist in ihr auf jeden Fall das C-terminale tryptische Fragment beginnend mit der Position 22 zu etwa 70 nMol zusammen mit dem Bruchstück Leu¹⁰-Lys²¹ im Verhältnis 1:3 enthalten. Hier wurde ebenfalls eine spezifische Lactonkopplung durchgeführt. Der Gipfel D der Abb.30 schließlich ergibt das unvollständig gespaltene Peptid Ala¹-Lys⁹, dessen Edman Abbau die Abb.31 zeigt. Ala in Schritt 1 tritt hier in zu geringer Menge auf, da offenbar ein Teil der N-terminalen Aminogruppen an das DITC-Glas gebunden ist. Etwa 70% der Seitenkettenfixierung findet an Lys⁷ statt, was an dem Ausbeuteabfall nach Schritt 6 zu erkennen ist, die restlichen 30% sind über Lys⁹ kovalent gebunden. Daß in der Aminosäurenanalyse (Tab.10, Abb.30b D) nur ein Lys erscheint, bleibt ungeklärt.

Mit dem Abbau der Fraktion E aus Abb.30a sollte es möglich sein, die noch fehlenden Positionen 16 und 22 sicher zu ermitteln, vielleicht sogar die Sequenz bis zum Ende durchzuführen. Das Ergebnis der Daten aus dem Massenspektrometer ist in Abb.32 gezeigt. Hier zeigt sich zunächst bei der MM = 272, daß die Position 16 eindeutig His zuzuordnen ist. Der Verlauf der Werte für das fragmentierte Ser-PTH (MM=204) ergibt neben den bekannten Stellen Ser für Schritt 22 und, mit Vorbehalt, auch für 34. Das für die Position 35 bereits vermutete Gly kann hier verifiziert werden (MM=192). Weiter kann nach dem Verlauf der Kurven mit MM = 234 und 232 der fragliche Schritt in 31 zugunsten von Pro entschieden werden. Der C-Terminus des CB₄ (Hse) scheint nach 37 Schritten erreicht zu sein, wenn man die Kurve für Hse-PTH betrachtet. Ungeklärt bleibt die Position 36, der nach Massenspektrometer Thr und nach den hier nicht gezeigten HPLC-Daten ein Glu zuzuschreiben wäre.



Schritte

Abb.32 Edman Abbau der Fraktion E aus der Abb.30a
Gezeigt sind die bereits korrigierten Ausbeuten an PTH
pro Abbauschritt am MS



Schritte

Abb.33 Edman-Abbau der Fraktion C aus Abb.30b
Gezeigt sind die bereits korrigierten Ausbeuten an PTH
pro Abbauschritt nach MS

Auch durch einen Vergleich mit den bisher bekannten Aminosäureanalysen (s.Tab.9 und Tab.10 Fraktion D aus 30a) ist keine endgültige Klärung möglich; zwar scheinen eher fünf als vier Glx pro CB_4 vorzuliegen, doch ist in beiden der Wert für Thr so, daß diese Aminosäure durchaus in einer Kopie pro Molekül auftreten könnte. Somit war es notwendig, eine nochmalige, möglichst reine Darstellung des C-terminalen tryptischen Peptids durchzuführen.

3.6.2.3. Trennung der tryptischen Peptide mit HPLC

Auf Grund der durchgeführten Vorversuche (s. 3.2.2.) sollte es möglich sein, reinere Peptide mit Hilfe der HPLC zu erhalten. Geplant waren die Verwendung des gleichen Puffersystems



Abb.34 Trennung eines tryptischen Spaltansatzes von CB_4

Biogel P-6
0.8 x 150 cm
30% HOFo
1.5 ml/h

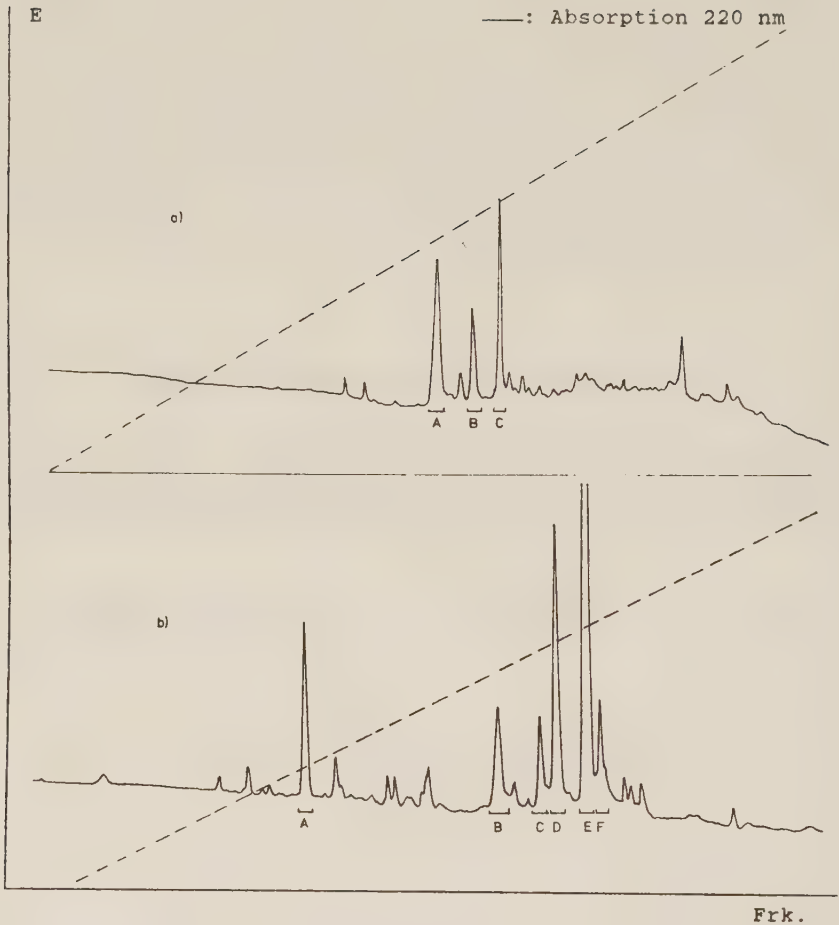


Abb.35 Chromatographie der Fraktionen A und B der Abb.34 auf HPLC

Serva RP-8
 20 mM NH_4TFA , pH 2.0
 0.7 ml/min
 T = 50°C

- a) Fraktion A aus Abb.34
 Gradient: 0 - .9 MeOH (---)
- b) Fraktion B aus Abb.34
 Gradient: 0 - .6 MeOH (---)

und der gleichen Säule wie oben für die Versuche mit Myoglobin und Rinderserumalbumin dargestellt.

Zunächst wurde ein tryptischer Spaltansatz mit ca. 650 nmol wie schon beschrieben an Biogel P-6 getrennt (s. Abb. 34). Von den in Frage kommenden Fraktionen A und B wurden zunächst jeweils 1/4 zur Trennung eingesetzt. Die beiden Kurvenverläufe nach HPLC sind in der Abb. 35a und b dargestellt. Sowohl bei der Auswertung der N-Termini mit der Dansylchloridmethode wie auch das Ergebnis der Aminosäurenanalyse zeigten, daß die Proben trotz Trocknens bei erhöhter Temperatur noch reichlich Ammoniumionen enthalten mußten, die beide Nachweise empfindlich stören.

	35a			35b				
	A	B	C	A	C	D	E	F
Asx	1.9	1.8	.5	1.0	3.0	2.2	-	1.8
Thr	1.0	-	-	-	-	-	-	-
Ser	2.1	1.7	1.1	-	3.8	1.9	2.1	3.6
Hse	-	.9	-	-	1.0	1.4	-	1.1
Glx	2.1	2.7	1.1	1.0	4.1	3.2	1.4	3.0
Pro	?	?	?	?	?	?	?	?
Gly	2.4	1.0	.5	-	2.3	1.3	-	1.9
Ala	1.8	.7	.9	2.0	2.6	1.2	1.2	2.2
Val	1.0	3.3	.6	.8	5.2	3.0	-	2.8
Ile	.8	.7	.8	.8	1.9	1.0	1.0	1.3
Leu	1.2	-	2.3	-	2.1	-	2.9	2.9
Tyr	-	-	.7	-	.7	-	.8	.7
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-
His	-	-	.7	-	.9	-	1.0	.7
Lys	1.0	-	.8	1.6	1.0	-	1.0	1.1
Arg	?	?	?	?	?	?	?	?

Tab.11 Aminosäurezusammensetzung der Fraktionen aus HPLC der Abb. 35a und b. Die angegebenen Werte geben die bestmögliche Berechnung in Mol Aminosäure/Mol Peptid nach den erhaltenen Analysedaten an, Pro wurde in allen Fällen nicht detektiert, der Nachweis von Arg war durch den Ammoniakgehalt der Proben unmöglich.

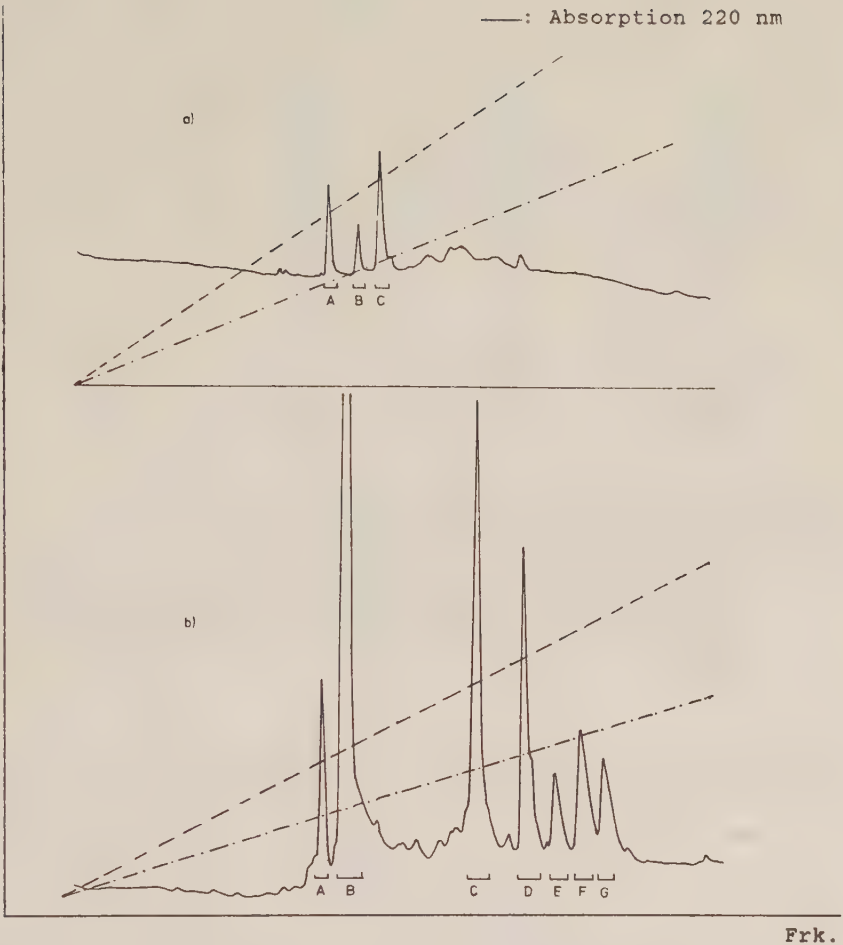
Immerhin konnten die Fraktionen B und C der Abb.35a nach manueller Auswertung der Aminosäureanalysen den Peptiden Ser²²-Hse³⁷ bzw. Leu¹⁰-Lys²¹ zugeordnet werden. Überraschenderweise enthielten diese beiden Fraktionen noch weitere Bruchstücke als Verunreinigung. Die Fraktion A der Abb.35a schließlich enthielt auf jeden Fall ein Gemisch aus mindestens zwei verschiedenen tryptischen Peptiden (s.Tab.11). Bei der Trennung des zweiten Gipfels aus der Abb.34 wurde ein vielfältigeres Muster erhalten (s.Abb.35b). Hier zeigten sich unter der Fraktion B nach Aminosäureanalyse nur Spuren von Protein, wohingegen die anderen zum Teil eindeutig getrennte tryptische Fragmente enthielten (s.Tab.11):

- A: Ala¹-Lys⁹
- C: Leu¹⁰-Hse³⁷
- D: Ser²²-Hse³⁷
- E: Leu¹⁰-Lys²¹
- F: Leu¹⁰-Hse³⁷.

Somit war zwar prinzipiell ein Weg gezeigt, um zu gereinigten Fragmentpeptiden zu gelangen, andererseits stellte die Verunreinigung mit Ammoniumionen doch ein Problem dar. Diese könnten sich nämlich neben den Schwierigkeiten beim analytischen Nachweis zusätzlich als sehr störend bei einer geplanten Kopplung über die Lactongruppen erweisen. Folglich mußten die einzelnen Fraktionen nach der Trennung auf HPLC noch über ein kleinporiges Molekülsieb entsalzt werden. Die in den bisher beschriebenen Versuchen eingesetzte HPLC-Säule entwickelte bei einem der nachfolgenden Reinigungsläufen einen sehr hohen Gegendruck, so daß sie nicht mehr verwendbar war. Beim Einsatz einer neuen Säule des gleichen Fabrikats stellte sich heraus, daß diese völlig andere Trenneigenschaften aufwies (s. 3.2.2.).

Die Trennung der jeweiligen Reste der Gipfel A und B aus Abb.34 ist in der Abb.36a und b dargestellt, die dazugehörigen Aminosäureanalysen sind in Tab.12 aufgelistet.

—: Absorption 220 nm



Frk.

Abb.36 Trennung tryptischer Peptide von CB₄ auf HPLC

Serva RP-8
 20 mM NH₄TFA, pH 2.0
 1.0 ml/min
 T = 50°C

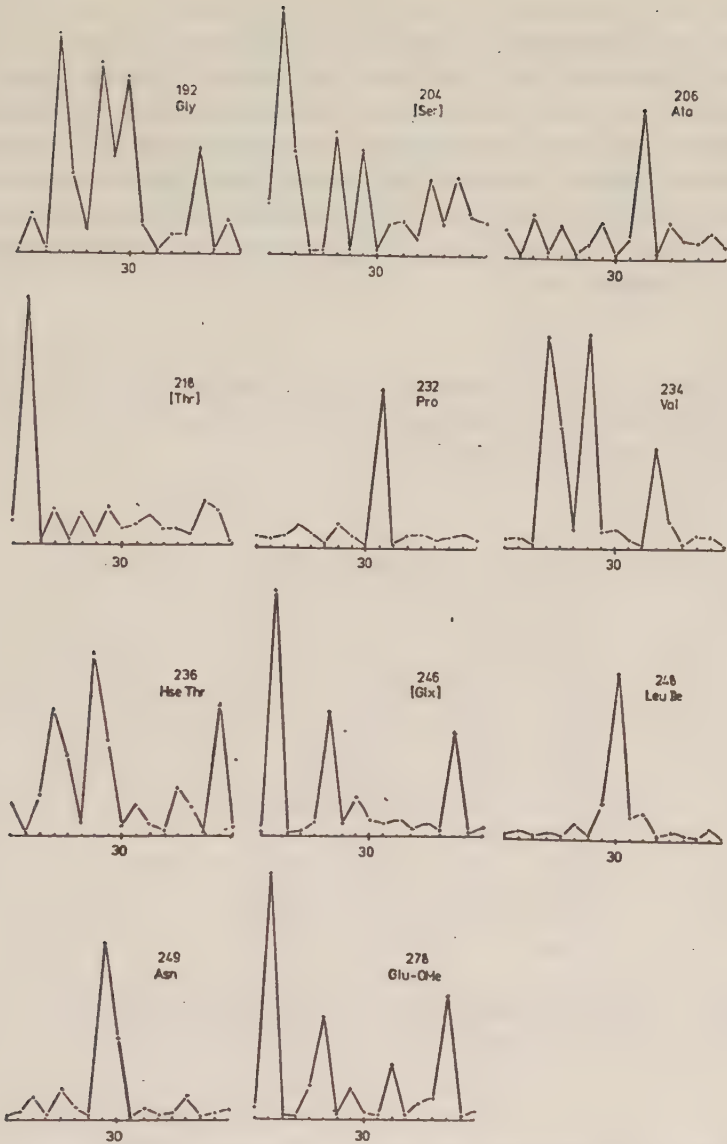
- a) Rest der Fraktion A aus Abb.34
 Gradient: 0 - .6 MeOH (---); 0 - .24 ProH (-.-.-)
- b) Rest der Fraktion B aus Abb.34
 Gradient: 0 - .5 MeOH (---); 0 - .3 ProH (-.-.-)

36a		36b			
	A	A1	A2	B	C
Asx	2.1	69.2	1.2	78.1	.7
Thr	-	11.8	-	19.4	-
Ser	1.7	52.0	.7	40.7	1.8
Hse	.9	44.0	-	24.8	-
Glx	2.7	90.4	1.2	88.6	1.6
Pro	1.0	25.4	-	11.6	.9
Gly	1.7	42.1	.9	40.0	.6
Ala	1.3	42.2	1.6	127.1	1.4
Val	3.1	105.4	.9	77.3	-
Ile	1.1	30.3	-	39.7	1.0
Leu	-	10.8	-	11.1	2.6
Tyr	-	3.4	.5	-	-
Phe	-	4.5	-	-	-
His	-	3.7	-	5.3	.9
Lys	-	12.3	1.0	63.5	1.1
Arg	-	5.7	-	12.5	-

Tab.12 Aminosäurenanalysen der HPLC aus Abb.36

In den Spalten 36b A1 und B sind jeweils die Gesamt-
mengen an Aminosäuren angegeben, hier handelt es sich
um Gemische aus mindestens zwei Peptiden. In den rest-
lichen Spalten sind die jeweils bestmöglichen An-
näherungswerte in Mol Aminosäure/Mol Peptid aufgeli-
stet.

Die Fraktionen B und C aus 36a bzw. D bis G aus 36b enthalten
nur Spuren von Protein, sie wurden nicht weiter verwertet.
Unter dem Gipfel A in 36a verbirgt sich eine geringe Menge
des reinen C-terminalen tryptischen Peptids Ser²²-Hse³⁷.
Aufgrund der Zusammensetzung liegt schon hier der Verdacht
nahe, daß der fehlenden Position 36 eher Glu zuzuordnen ist.
Bei der Entsalzung der Fraktion A aus 36b an Biogel P-2
konnten zwei Gipfel getrennt werden, die in Tab.12 mit A1 und
A2 bezeichnet sind. Während in A2 das reine N-terminale
Peptid Ala¹-Lys⁷ vorliegt, enthält A2 ein Gemisch mit dem
Peptid Ser²²-Hse³⁷ neben einem weiteren Lys-haltigen im
Verhältnis von etwa 3/1. Fraktion B besteht aus einer Mi-
schung von mindestens zwei Peptiden, wobei aber hier die
Hauptkomponente von Ala¹-Lys⁹ gestellt wird. Der Gipfel 36b C
schließlich beinhaltet wiederum ein Fragment, Leu¹⁰-Lys²¹.



Schritte

Abb.37 Edman-Abbau des Peptids Ser²²-Hse³⁷ nach Reinigung mit HPLC. Gezeigt sind die bereits korrigierten Ausbeuten pro Abbauschritt nach dem Massenspektrometer

masse von 3917. Typischerweise werden so hydrophobe Aminosäuren wie Val und Ile nach der Analyse zu niedrig berechnet, der zu hohe Gehalt an Gly spricht wohl für eine teilweise Zerstörung von empfindlichen Aminosäuren (z.Bsp. Ser) unter den Bedingungen der Hydrolyse. Das Auftreten von Arg in der Analyse der Tab.9 ist auf eine Kontamination entweder bedingt durch den Präparationsweg oder durch CB₁₁ zurückzuführen, in später durchgeführten Analysen war der Anteil stets kleiner als eins.

3.7. Teilsequenz des CNBr-Peptids CB₁₁

Das große CNBr-Peptid CB₁₁ zeichnet sich in seiner Aminosäurezusammensetzung durch einen hohen Gehalt an sauren Aminosäuren (Asx und Glx zusammen ca. 25%) aus. Gly, Ala, Val und Leu sind jeweils zu etwa 10% vertreten. Das Vorkommen von 2 bis 3 Arg und ca. 5 Lys auf der einen Seite und das Auftreten von 1 bis 2 Tyr auf der anderen Seite zeigen bereits die Richtungen für etwaige Fragmentierungen an.

3.7.1. Edman-Abbau des gesamten Peptids

Zunächst wurde versucht, das gesamte Peptid über seine Lys-Seitenketten an den festen Träger zu fixieren. Dazu wurde in üblicher Weise ein entsprechendes Aliquot (ca. 100 nmol) zweimal in TFA gelöst und im beheizten Exsikkator rasch eingetrocknet. Nach Lösen in DMF und Zugabe von Triethylamin und DITC-Glas wurde die Kopplungsreaktion für 6 h bei 56°C durchgeführt. Der automatische Edman-Abbau erbrachte als Ergebnis in Stufe 1 lediglich das von der Bestimmung des N-Terminus bereits bekannte Gly. Ein weiterer Versuch war nicht erfolgreicher, eine Rückhydrolyse des beladenen Glases erbrachte einen gekoppelten Anteil von kleiner 10 nmol. Gründe für das Versagen der Festphasenmethode konnten zu diesem Zeitpunkt nicht gefunden werden, es mußte zunächst angenommen werden, daß in der zweiten Position ein Gln zu Pyro-Glu reagiert hatte.

Die Analyse mittels eines Flüssigphasen-Sequenators ergab dann für den N-terminalen Bereich des CB₁₁ folgende Primärstruktur:

1	5	10	15
Gly-Val-Leu-Ala-Asn-His-Val-Pro-Gln-Ile-Glu-Gln-Leu-Lys-Pro-			
Gly-Leu-Val-Glu-Val-Ile-Glu-E/Q-(S)-Gly-(Q)-Asn- ? -Gln-Tyr-			
? -			

Dies ist das Ergebnis zweier Läufe, die in Klammern gesetzten Aminosäuren sind als fraglich anzusehen. Als minimale Nebensequenz tauchte die Folge Ala-Glu-Ala..., dies entsprach einer Verunreinigung der Präparation mit CB₄.

3.7.2. Spaltung von CB₁₁ und Sequenz der Peptide

Für die weitere Fragmentierung des großen CNBr-Peptids CB₁₁ boten sich auf Grund der Aminosäurenanalyse zunächst eine limitierte tryptische Spaltung nach Arg (2 bis maximal 3 pro Peptid) an. Dazu wurde das Peptid in Pyridin/H₂O und 0.1 M Na₄P₂O₇ gelöst. Die Umsetzung mit Citraconsäureanhydrid wurde so durchgeführt, daß der pH mit 5 N NaOH zwischen 8.1 und 8.5 gehalten wurde. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf einem kleinporigen Gel entsalzt. Eine Kontrolle der Umsetzung der Lys-Seitenketten war über die Reaktion mit Dansylchlorid leicht zu verfolgen. Die vereinigten, das umgesetzte Peptid enthaltenden Fraktionen wurden direkt mit der entsprechenden Menge Trypsin zur Reaktion gebracht, mit HOFO die Reaktion gestoppt und der eingeengte Ansatz auf einem Molekülsieb aufgetrennt (s. Abb. 38). Nach der Bestimmung der Endgruppen und nach Aminosäurenanalyse zeigte es sich, daß die vorderen Gipfel Trypsin und seinen Fragmenten zuzuordnen sind.

Die in der Abb. 38 markierten Fragmente wurden über die Aminosäureseitenketten an DITC-Glas fixiert und einem Edman-Abbau unterzogen. Dabei zeigte sich, daß bei keinem der Peptide trotz Einsatz unterschiedlicher Trennmedien und -puffer eine saubere Trennung erreicht worden war, bei 38b Gipfel E und F und bei 38c Gipfel B gab es halbwegs verwertbare Ergebnisse:

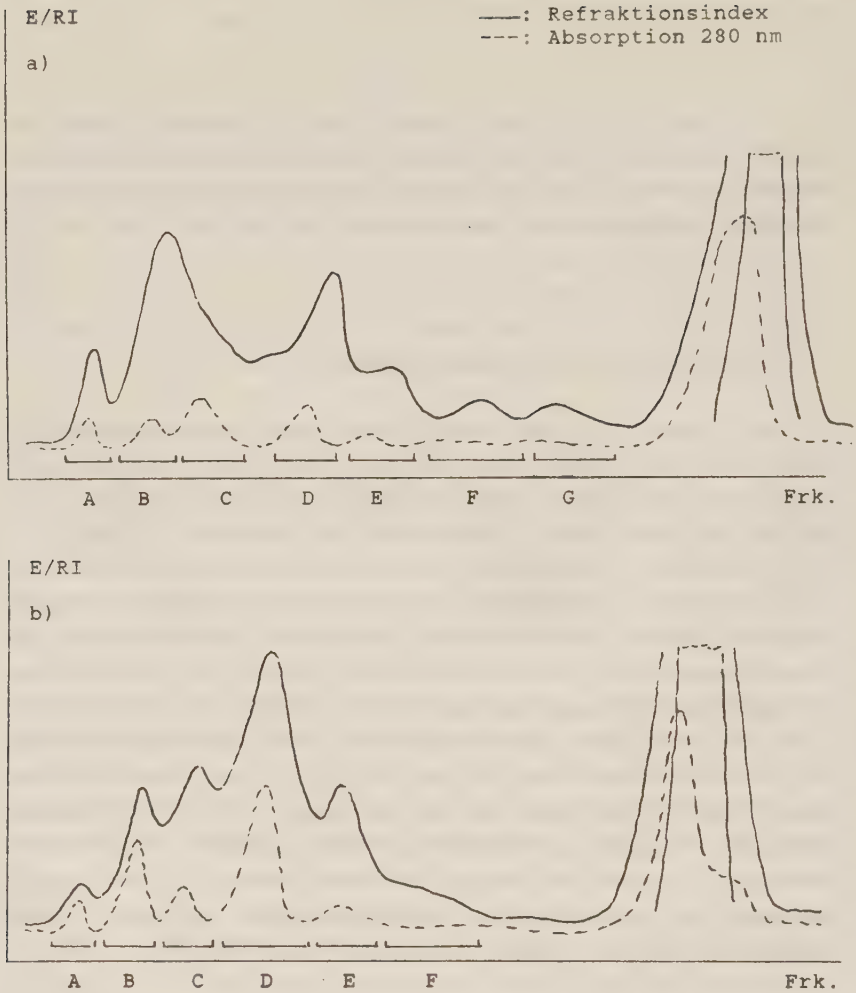


Abb.38 Trennung der Spaltpeptide des CB₁₁ nach Umsetzung mit Citraconsäureanhydrid und Trypsin

a) Biogel P-10 -400 mesh
0.8 x 150 cm
10% HOAc
1.2 ml/h

b) Biogel P-30 -400 mesh
0.7 x 150 cm
80% HOFo
0.6 ml/h

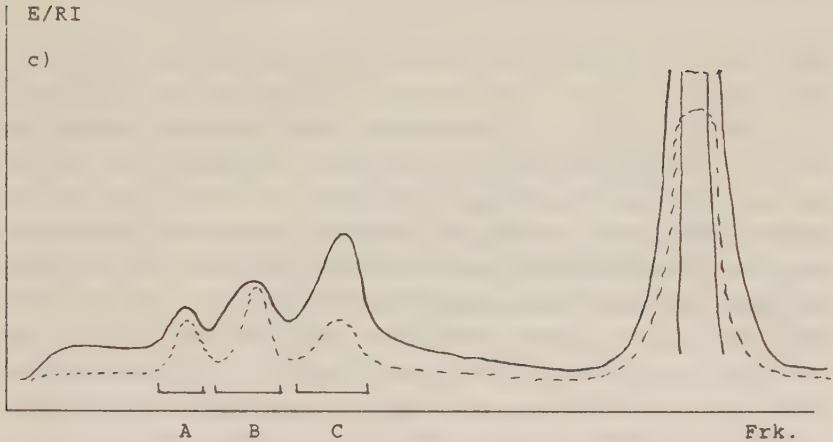


Abb.38 (Forts.) Trennung der Spaltpeptide von CB₁₁

c) Sephadex G50 sf
 0.7 x 150 cm
 30% HOFO
 0.9 ml/h

- a) E: Ala-V/Q-I/L-Ala-Asn-(A)-(Q)-(P)-
 b) F: A/G-V/Q-I/L-Ala-E/N-Ala-V/Q-Pro- ? -I/V-Glu-Gln-Leu- ?
 -Pro
 c) B: ? -Val-I/L-Ala-P/N- ? -Val-

Berücksichtigt man, daß bei der angewendeten Kopplungsmethode

1. oft auch die N-terminale Aminogruppe fixiert wird und
2. die trägergebundenen Lys natürlich nicht detektiert werden können,

so kann man daraus nach Abzug der bisher bekannten Positionen mit einigen Vorbehalten auf eine mögliche zweite Sequenz schließen:

(R)-Ala-Gln-Ile-Ala-Glu-Ala-Gln- ? - ? -Val-

Eine zweite Fragmentierung des CB₁₁ nach dem oben beschriebenen Verfahren mit nachfolgenden Chromatographien in basischen Puffern wie 0.1 M AHC brachte keine anderen Ergebnisse, was hier zusätzlich auffiel, war der drastische Verlust an Material bis zur Kopplung, z.T. waren es mehr als 90% der Ausgangsmenge. Die Ursache für die sehr schlechten Trennungen auf den Molekülsieben könnte unter Umständen in der nicht vollständigen Abspaltung der Citraconsäurereste von den Lys-Seitenketten nach saurer Behandlung sein. Weiter ist noch die Möglichkeit gegeben, daß die Spaltpeptide von sehr ähnlicher Größe sind, und damit grundsätzlich eine komplette Trennung nur durch Gelchromatographie nicht zu erzielen ist.

Als weitere Spaltstelle kommt das Tyr in Frage (1-2 Kopien/Molekül). Versuche hierzu ergaben allerdings, daß durch den gesamten Präparationsweg die Tyr-Seitenkette offenbar so verändert wurde (z.B. durch Oxidation), daß nur ganz geringe Spaltungsausbeuten erzielt werden konnten.

3.8. Vorhersagen zur Sekundärstruktur

Zur Vorhersage der Sekundärstruktur wurde das Konzept von Chou und Fasman [1974] auf den bekannten Teil der δ -Untereinheit angewandt. Zur Berechnung wurden die in [Chou & Fasman 1978] angegebenen P-(Wahrscheinlichkeits-)Werte eingesetzt. Das Programm wurde auf einem Tischrechner (Apple //e) erstellt, der Ausdruck wurde so gewählt, daß auch die Wahrscheinlichkeiten für Beginn und Ende einer α -Helix bzw. β -Faltblatt angegeben wurde. Das Ergebnis ist in der Abb.39 gezeigt. Der Abschnitt Ala¹ bis Leu¹⁰ ergibt eine α -Helix, der anschließende Bereich wird von Haarnadelbiegungen bzw. ungeordneter Struktur bestimmt. Ab His¹⁶ zeigt sich ein deutliches Faltblatt, das bis Val²⁸ reicht, wiederum gefolgt von Haarnadelbiegungen. Die anschließende α -Helix (Ser³⁴ bis Glu⁴⁸) könnte in der zweiten Hälfte auch einer Faltblattstruktur zugeordnet werden, hier sind die berechneten Werte nicht ganz eindeutig. Deutlich dagegen ergibt sich eine Haarnadelbiegung von Gln⁴⁹ - Pro⁵², anschließend folgt eine Helix, deren Ende bei Ser⁶¹ liegen könnte. Die nachfolgenden Gly⁶² - Asn⁶⁴ bilden sehr wahrscheinlich wiederum einen Bereich mit ungeordneter Struktur. Da für die Berechnung immer Pakete aus 4 bzw. 6 aufeinander folgenden Aminosäuren eingesetzt werden, kann ab dieser Position keine vernünftige Aussage mehr gemacht werden.

Wendet man dieses Verfahren auf die δ -Untereinheit von *E. coli* an, so stellt man fest, daß dieses Protein einen sehr hohen Anteil an langen, nicht unterbrochenen α -Helices aufweist; somit erscheint eine Homologie zwischen den δ -Untereinheiten von Bakterien und Eukaryonten eher unwahrscheinlich.

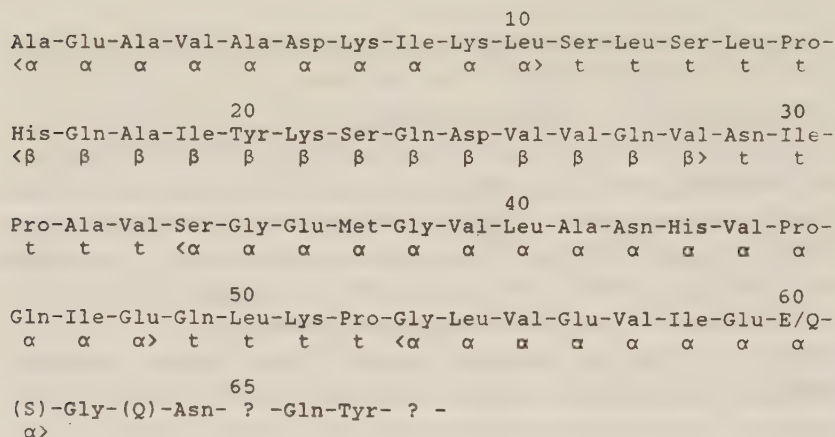


Abb.39 Zur Sekundärstruktur der δ-Untereinheit

<α...α> : α-Helix

<β...β> : Faltblatt

t...t : Haarnadelbiegungen, bzw. ungeordnete Bereiche

3.9. Vergleich mit Untereinheiten bakterieller ATPasen

Vergleicht man die Primärstrukturen der kleinen Untereinheiten von F_1 aus *E. coli* direkt mit der δ -Untereinheit aus *N. crassa*, so stellt man fest, daß es beträchtliche Homologien nicht zur δ -, sondern zur ϵ -Untereinheit gibt. Dagegen findet die hier beschriebene δ -Untereinheit ihr entsprechendes Gegenstück in der H^+ -ATPase des Rindes, von dem kürzlich ein Fragment sequenziert wurde [Walker et al. 1982a]. Dieser Sachverhalt ist in der Abb.40 gezeigt.

	10	
Ala-Glu-Ala-Val-Ala-Asp-Lys-Ile-Lys-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Pro-		
	20	30
His-Gln-Ala-Ile-Tyr-Lys-Ser-Gln-Asp-Val-Val-Gln-Val-Asn-Ile-		
		...-Gln-Val-Asp-Val-
		...Ser-Gly-Leu-Val-Glu-Lys-Ile-Gln-Val-
	40	
Pro-Ala-Val-Ser-Gly-Glu-Met-Gly-Val-Leu-Ala-Asn-His-Val-Pro-		
Pro-Thr-Gln-Thr-Gly-Ala-Phe-Gly-Ile-Leu-Ala-Ala-His-Val-Pro-		
Thr-Gly-Ser-Glu-Gly-Glu-Leu-Gly-Ile-Tyr-Pro-Gly-His-Ala-Pro-		
	50	60
Gln-Ile-Glu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Leu-Val-Glu-Val-Ile-Glu-E/Q-		
Thr-Leu-Gln-Val-Leu-Arg-Pro-Gly-Leu-Val-Val-Val-His-Ala-Glu-		
Leu-Leu-Thr-Ala-Ile-Lys-Pro-Gly-Met-Ile-Arg-Ile-Val-Lys-Gln-		
(S)-Gly-(Q)-Asn- ? -Gln-Tyr- ? -...		
Asp-Gly-Thr-Thr-Ser-Lys...		
His-Gly-His-Glu-Glu-Phe-Ile-Tyr...		

Abb.40 Homologien zwischen den δ -Untereinheiten aus *N. crassa* (1. Zeile) und Rind (2. Zeile) und der ϵ -Untereinheit aus *E. coli* (3. Zeile)

In der Arbeit von Walker wurde schon darauf hingewiesen, daß die Homologien der kleinen Untereinheiten anders sind, als von der Reihenfolge aus der Gelelektrophorese zu erwarten wäre. Die Autoren konnten weiter zeigen, daß die δ -Untereinheit aus BF_1 letztlich homolog zum OSCP der mitochondrialen ATPase ist.

3.10. Ausblick

Kurz vor Beendigung dieser Arbeit wurde die komplette Primärstruktur der δ -Untereinheit aus *Neurospora crassa* über die Sequenzierung der cDNS ermittelt (Abb.41) [Sebald & Kruse 1984].

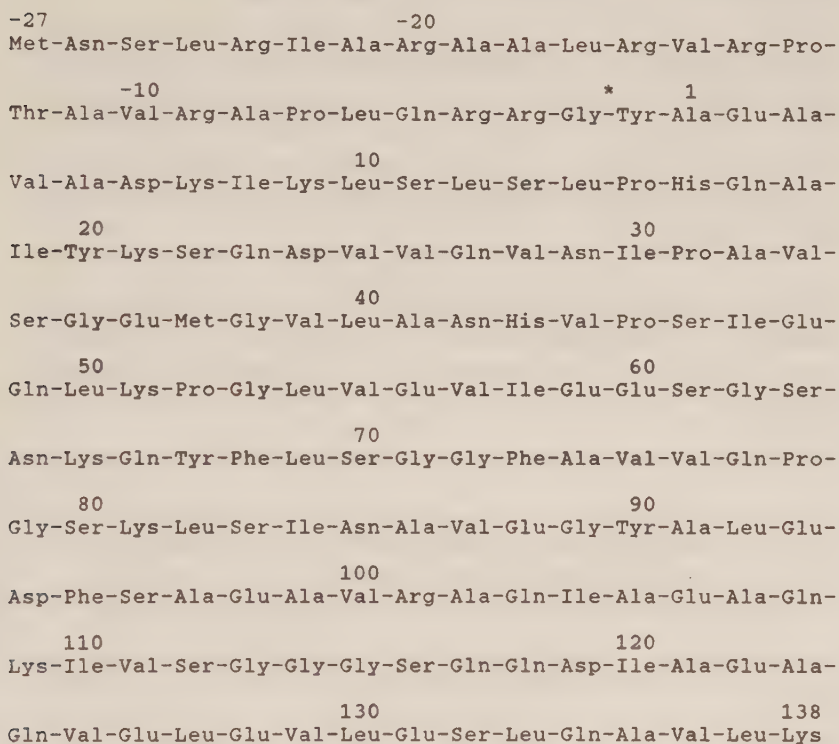


Abb.41 Primärstruktur der δ -Untereinheit aus *Neurospora crassa* nach der Nukleotidsequenz des Gens [Sebald & Kruse 1984]. Die mit einem (*) markierte Bindung wird von den Autoren als Spaltstelle für die Prozessierung angenommen.

Dabei gingen die Autoren wie folgt vor: durch Homologievergleiche mit der bekannten Sequenz eines Bruchstücks aus Rinderherz (s.Abb.40) [Walker et al. 1982a] wie auch Vergleiche zu den Untereinheiten aus *E. coli* (s.Abb.40) konnte das richtige Ableseraster auf der DNS gefunden werden; das Startcodon ATG für die Vorstufe war das einzige innerhalb einiger hundert Basen vor der codierenden Sequenz. Weiter zeigten die letzten acht Basen vor dem Startcodon eine beträchtliche Ähnlichkeit zu entsprechenden Positionen auf den mRNS anderer mitochondrialer Membranproteine.

Vergleicht man die beschriebene Primärstruktur mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, so findet man bis auf die Positionen ab 63 Übereinstimmung (s.Abb.40, 1.Zeile). Das fragliche Bruchstück, das nach limitierter tryptischer Spaltung des CB₁₁ gefunden worden war, läßt sich ab der Position Arg¹⁰¹ finden.

Ordnet man die δ -Untereinheit und ihre Vorstufe den bisher bekannten Präsequenzen anderer mitochondrialer Proteine und ihren jeweiligen Spaltstellen zu, so ergibt sich folgendes Bild:

-1 * 1

1. -Ala-Gln-Val-Ser-Lys-Arg-Thr-Ile-Gln-Thr-Gly-
2. -Gln-Ala-Phe-Gln-Lys-Arg-Ala-Tyr-Ser-Ser-Glu-
3. -Arg-Thr-Ala-His-Lys-Arg-Ser-Leu-Tyr-Leu-Phe-
4. -Ala-Pro-Leu-Gln-Arg-Arg-Gly-Tyr-Ala-Glu-Ala-

1. entspricht der ersten und 2. der zweiten Spaltstelle für die Prozessierung des Proteolipids aus *Neurospora crassa* [Schmidt et al. 1984], 3. entspricht der Verbindungsstelle zwischen N-terminaler Verlängerung und maturer Form der Cytochrom-c-Peroxidase aus Hefe [Kaput et al. 1982]. Offenbar

sind hier die Erkennungssequenzen für die prozessierenden Proteasen so, daß eine Abfolge von zwei basischen und einer kleinen Aminosäure die Spaltstelle markiert (*). Dieses trifft jedoch für die Prozessierung der δ -Untereinheit (4.) nicht zu, danach müßte hier das reife Protein mit einem Tyr beginnen [Sebald & Kruse 1984]. Dies muß wohl als Hinweis darauf gewertet werden, daß zwar Proteasen existieren, die jeweils für die Prozessierung ganzer Gruppen von Vorstufen verantwortlich sind, daß aber im Fall der H^+ -ATPase in *Neurospora crassa* die Vorstufen von δ und der Untereinheit 9 (Proteolipid) von verschiedenen Enzymen gespalten werden. Welche Konsequenzen dieses zusätzlich für die Assemblierung oder stöchiometrische Zusammensetzung des gesamten Komplexes hat, bleibt abzuwarten.

4. Zusammenfassung

- In dieser Arbeit wurde die Gewinnung und Reinigung präparativer Mengen der δ -Untereinheit aus der F_1 -ATPase (*Neurospora crassa*), eines membranständigen Enzymkomplexes, durchgeführt.
- Von einigen Spaltpeptiden einschließlich des N-Terminus wurde die Primärstruktur über den Edman-Abbau mit der Festphasenmethode bestimmt.
- Dabei wurden methodische Untersuchungen zur Trennung von Proteinen und Spaltpeptiden mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie durchgeführt und ein System erstellt, mit dem prinzipiell die Trennung und Isolierung von Spaltpeptiden möglich ist.
- Aus der Kenntnis der Primärstruktur des nativen Proteins läßt sich zeigen, daß die bisher postulierte, für mehrere mitochondriale Präproteine typische Prozessierungsstelle bei der δ -Untereinheit an einer anderen Position sitzt, diese somit offenbar nicht zu der oben beschriebenen Gruppe gehört oder aber das Konzept der gruppenspezifischen Prozessierung noch verfeinert werden muß.
- Hat man das entsprechende Gen zur Verfügung, so ist heute die Strukturermittlung über die Sequenzierung der DNS sicher der effizientere Weg, wie am Beispiel der kompletten Aminosäureabfolge (d.h. einschließlich Präsequenz) der δ -Untereinheit aus *Neurospora crassa* gezeigt wurde. Allerdings benötigt man immer noch Informationen aus der Proteinsequenzierung, um beispielsweise die Startposition des Ableserasters zu ermitteln oder um Aussagen über Aussehen und Funktion der Proteine machen zu können, die erst nach

einigen Prozessierungsschritten in ihrer maturen Form vorliegen.

5. Literatur

- Abrams A. Smith J.B. (1974)
in The Enzymes (Boyer ed.) 3rd ed., Academic Press New York
10: 395-429
- Adolfson R. McClung J.A. Moudrianakis E.N. (1975)
Biochemistry 14: 1727-1735
- Amzel L.M. Pedersen P.L. (1978)
J.Biol.Chem. 253: 2067-2069
- Amzel L.M. (1981)
J.Bioenerg.Biomembr. 13: 109-121
- Amzel L.M. McKinney M. Narayanan P. Pedersen P.L. (1982)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 79: 5852-5856
- Amzel L.M. Pedersen P.L. (1983)
Ann.Rev.Biochem. 52: 801-824
- Andreu J.M. Larraga V. Muñoz E. (1977)
in Bioenergetics of Membranes (Packer et al. eds) Elsevier
Amsterdam 527-536
- Andreu J.M. Warth R. Muñoz E. (1978)
FEBS Lett. 86: 1-5
- Apps D.K. Glover L.A. (1978)
FEBS Lett. 85: 254-258
- Azzi A. (1980)
Biochim.Biophys.Acta 594: 231-252
- Azzone G.F. Pozzan T. Bragadin M. (1977)
in Structure and Function of Energy-Transducing Membranes
(eds. K. van Dam et al.) Amsterdam Elsevier 107 ff
- Baird B.A. Hammes G.G. (1976)
J.Biol.Chem. 251: 6953-6962
- Baird B.A. Hammes G.G. (1977)
J.Biol.Chem. 252: 4743-4748
- Beechey B.R. Hubbard S.A. Linnett P.E. Mitchell D.A. Munn
E.A. (1975)
Biochem.J. 148: 533-537
- Bennum A. Racker E. (1969)
J.Biol.Chem. 244: 1325-1331

Bertina R.M. Schrier P.I. Slater E.C. (1973)
 Biochim.Biophys.Acta 305: 503-525

Biketov S.F. Kasho V.N. Kozlov I.A. Mileykovskaya Y.I.
 Ostrovsky D.N. Skulachev V.P. Tikhonova G.V. Tsuprun V.L.
 (1982)
 Eur.J.Biochem. 129: 241-250

Binder A. Jagendorf A.T. Ngo E. (1978)
 J.Biol.Chem. 253: 3094-3100

Birktoft J.J. Blow D.M. (1972)
 J.Mol.Biol. 68: 187-240

Boyer P.D. (1965)
 in Oxidases and Related Redox Systems (eds.T.E.King et al.)
 New York Wiley 2: 994 ff

Boyer P.D. Cross R.L. Momsen W. (1973)
 Proc.Nat.Acad.Sci. 70: 2837-2839

Boyer P.D. Britton C. Ernster L. Mitchell P. Racker E.
 Slater E.C. (1977)
 Ann.Rev.Biochem. 46: 955-1026

Boyer P.D. Kohlbrenner W.E. McIntosh D.B. Smith L.T. O'Neal
 C.C. (1982)
 Ann.NY Acad.Sci. 402: 65-83

Bragg P.D. Davies P.L. Hou C. (1973)
 Arch.Biochem.Biophys. 159: 664-670

Bragg P.D. Hou C. (1975)
 Arch.Biochem.Biophys. 167: 311-321

Bragg P.D. Hou C. (1979)
 FEBS Lett. 103: 12-16

Capaldi R.A. Vanderkooi G. (1972)
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69: 930-932

Capaldi R.A. Malatesta F. Darley-USmar V.M. (1983)
 Biochim.Biophys.Acta 726: 135-148

Carreira J. Andreu J.M. Nieto M. Muñoz E. (1976)
 Mol.Cell.Biochem. 10: 67-76

Catterall W.A. Coty W.A. Pedersen P.L (1973)
 J.Biol.Chem. 248: 7427-7431

Chang T.M. Penefsky H.S. (1973)
 J.Biol.Chem. 248: 2746-2754

Chang T.M. Penefsky H.S. (1974)
 J.Biol.Chem. 249: 1090-1098

- Chang J.Y. Creaser E.H. Hughes G.J. (1977b)
FEBS Lett. 78: 147-150
- Chang J.Y. Creaser E.H. Hughes G.J. (1977c)
FEBS Lett. 84: 187-190
- Chang J.Y. Brauer D. Wittmann-Liebold B. (1978)
FEBS Lett. 93: 205-214
- Chou P.Y. Fasman G.D. (1974)
Biochemistry 13: 211-245
- Chou P.Y. Fasman G.D. (1978)
Adv.Enzymol. 47: 45-148
- Cintron N.M. Pedersen P.L. (1979)
J.Biol.Chem. 254: 307-311
- Clarke D.J. Fuller F.M. Morris J.G. (1979a)
Eur.J.Biochem. 98: 597-612
- Clarke D.J. Morris J.G. (1979b)
Eur.J.Biochem. 98: 613-620
- Cross R.L. (1981)
Ann.Rev.Biochem. 50: 681-714
- Cross R.L. Nalin C.M. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 2874-2881
- Deters D.W. Racker E. Nelson N. Nelson H. (1975)
J.Biol.Chem. 250: 1041-1047
- Dixon H.B.F. Perham R.N. (1968)
Biochem.J. 109: 312-314
- Downie J.A. Cox G.B. Langman L. Ash G. Becker M. Gibson F.
(1981)
J.Bacteriol. 145: 200-210
- Dunn S.D. Futai M. (1980)
J.Biol.Chem. 255: 113-118
- Dunn S.D. Heppel L.A. (1981)
Arch.Biochem.Biophys. 210: 421-436
- Edman P. (1950)
Acta Chem.Scand. 4: 277-282
- Enns R.K. Criddle R.S. (1977)
Arch.Biochem.Biophys. 182: 587-600
- Farron F. Racker E. (1970)
Biochemistry 9: 3829-3836

- Farron F. (1970)
Biochemistry 9: 3823-3828
- Ferguson S.J. Sorgato M.C. (1982)
Ann.Rev.Biochem. 51: 185-217
- Fillingame R.H. (1976)
J.Biol.Chem. 251: 6630-6637
- Fillingame R.H. (1980)
Ann.Rev.Biochem. 49: 1079-1113
- Fillingame R.H. (1981)
Curr.Top.Bioenerg. 11: 35-105
- Foster D.L. Fillingame R.H. (1979)
J.Biol.Chem. 254: 8230-8236
- Foster D.L. Fillingame R.H. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 2009-2015
- Frangione B. Rosenwasser E. Penefsky H.S. Pullman M.E. (1981)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 78: 7403-7407
- Friedl P. Friedl C. Schairer H.U. (1979)
Eur.J.Biochem. 100: 175-180
- Friedl P. Hoppe J. Gunsalus R.P. Michelsen O. von Meyenburg K. Schairer H.U. (1983)
EMBO J. 2: 99-103
- Futai M. (1977)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 79: 1231-1237
- Futai M. Kanazawa H. Takeda K. Kagawa Y. (1980)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 96: 227-234
- Futai M. Kanazawa H. (1983)
Microbiol.Rev. 47: 285-312
- Galante Y.M. Wong S.Y. Hatefi Y. (1981)
Biochemistry 20: 2671-2678
- Garret N.E. Penefsky H.S. (1975)
J.Biol.Chem. 250: 6640-6645
- Gay N.J. Walker J.E. (1981a)
Nuc.Acids Res. 9: 2187-2194
- Gay N.J. Walker J.E. (1981b)
Nuc.Acids Res. 9: 3919-3926
- Gibson F. Cox G.B. Downie J.A. Radik J. (1977)
Biochem.J. 164: 193-198

- Gibson F. Downie J.A. Cox G.B. Radik J. (1978)
J.Bacteriol. 134: 728-736
- Gomez-Fernandez J.C. Harris D.A. (1978)
Biochem.J. 176: 967-975
- Graf T. Sebald W. (1978)
FEBS Lett. 94: 218-222
- Gray W.R. (1972)
Methods Enzymol. 25: 121-138
- Gresser M.J. Cardon J. Rosen G. Boyer P.D. (1979)
J.Biol.Chem. 254: 10649-10653
- Gresser M. J. Myers J.A. Boyer P.D. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 12030-12038
- Gross E. Witkop B. (1961)
J.Am.Chem.Soc. 83: 1510-1511
- Hackenberg H. Riccio P. Klingenberg M. (1978)
Eur.J.Biochem. 88: 373-378
- Haller W. (1965)
Nature 206: 693-696
- Hammes G.G. (1982)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 79: 6881-6884
- Hanson R.L. Kennedy E.P. (1973)
J.Bacteriol. 114: 772-781
- Harold F.M. (1977)
Ann.Rev.Microbiol. 31: 181-203
- Harris D.A. Rosing J. van deStadt R.J. Slater E.C. (1973)
Biochim.Biophys.Acta 314: 149-153
- Harris D.A. Slater E.C. (1975a)
in Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation
(Quagliariello et al. eds) North Holland, Amsterdam 379-384
- Harris D.A. Slater E.C. (1975b)
Biochim.Biophys.Acta 387: 335-348
- Hatefi Y. (1976)
in The Enzymes of Biological Membranes (eds. A. Martonosi)
New York Wiley 4: 3 ff
- Hatefi Y. Yagi T. Phelps D.C. Wong S.Y. Vik S.B. Galante Y.M.
(1982)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 79: 1756-1760

Hauska G. (1978)
in Proc. 4th Int.Congr.Photosynth. (eds. D.O.Hall et al.)
London Biochem.Soc. 185 ff

Hess B. Loewenstein R. Kuschnitz D. (1978)
in Energetics and Structure of Halophilic Organisms (eds.
S.R.Caplan et al.) Amsterdam Elsevier 89 ff

Höckel M. Hulla F.W. Risi S. Dose K. (1976)
Biochim.Biophys.Acta 429: 1020-1028

Hoppe J. Friedl P. Schairer H.U. Sebald W. von Meyenburg K.
Jorgensen B.B. (1983)
EMBO J. 2: 105-110

Horn M.J. Laursen R.A. (1973)
FEBS Lett. 36: 285-288

Horstman L.L. Racker E. (1970)
J.Biol.Chem. 245: 1336-1344

Hurt E.C. Pesold-Hurt B. Schatz G. (1984)
EMBO J. 3: 3149-3156

Hurt E.C. Pesold-Hurt B. Suda K. Oppliger W. Schatz G. (1985)
EMBO J. 4: 2061-2068

Ishida M. Mizushima S. (1969)
J.Biochem. (Tokyo) 66: 133-138

Johansson B.C. Baltschefsky M. (1975)
FEBS Lett. 53: 221-224

Kagawa Y. Racker E. (1966a)
J.Biol.Chem. 241: 2461-2466

Kagawa Y. Racker E. (1966b)
J.Biol.Chem. 241: 2467-2474

Kagawa Y. Racker E. (1966c)
J.Biol.Chem. 241: 2475-2482

Kagawa Y. Sone N. Yoshida H. Hirata H. Okamoto H. (1976)
J.Biochem. 80: 141-151

Kagawa Y. (1978)
Biochim.Biophys.Acta 505: 45-93

Kagawa Y. Sone N. Hirata H. Masasuke Y. (1979)
J.Bioenerg.Biomembr. 11: 39-53

Kagawa Y. (1982)
Structure and Function of H^+ -ATPase (Sato R. Kagawa Y. eds)
Japan Scientific Society Press 37-56

- Kanazawa H. Kayano T. Mabuchi K. Futai M. (1981a)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 103: 604-612
- Kanazawa H. Mabuchi K. Kayano T. Noumi T. Sekiya T. Futai M.
(1981b)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 103: 613-620
- Kanazawa H. Kayano T. Kiyasu T. Futai M. (1982a)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 105: 1257-1264
- Kanazawa H. Mabuchi K. Futai M. (1982b)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 107: 568-575
- Kaput J. Goltz S. Blobel G. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 15054-15058
- Karu A.E. Moudrianakis E.N. (1969)
Arch.Biochem.Biophys. 129: 655-671
- Klingenberg M. Rottenberg H. (1977)
Eur.J.Biochem. 73: 125-130
- Klingenberg M. (1978)
Naturwissenschaften 65: 456-463
- Knowles A.F. Guillory R. Racker E. (1971)
J.Biol.Chem. 246: 2672-2679
- Knowles A.F. Penefsky H.S. (1972a)
J.Biol.Chem. 247: 6617-6623
- Knowles A.F. Penefsky H.S. (1972b)
J.Biol.Chem. 247: 6624-6630
- Kohlbrenner W.E. Boyer P.D. (1983)
J.Biol.Chem. 258: 10881-10886
- Kozlov J.A. Skulachev V.P. (1977)
Biochim.Biophys.Acta 463: 29-89
- Kröger A. (1979)
Biochim.Biophys.Acta 505: 129-143
- Laemmli U.K. (1970)
Nature 227: 680-685
- Lardy H.A. Ferguson S.M. (1969)
Ann.Rev.Biochem. 38: 991-1034
- Laursen R.A. (1971)
Eur.J.Biochem. 20: 89-102
- Laursen R.A. Horn M.J. Bonner H.G. (1972)
FEBS Lett. 21: 67-70

- Laursen R.A. Machleidt W. (1980)
Methods Biochem. Anal. 26: 201-284
- Lee H.M. Riordan J.F. (1978)
Anal. Biochem. 89: 136-142
- Lien S. Racker E. (1971)
Methods Enzymol. 23: 547-555
- Lien S. Berzborn R.J. Racker E. (1973)
J. Biol. Chem. 248: 3520-3524
- Livne A. Racker E. (1969)
J. Biol. Chem. 244: 1332-1338
- Loo T.W. Bragg P.D. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 103: 52-59
- Lowry O.H. Rosebrough N.J. Farr A.L. Randall R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193: 265-275
- Mabuchi K. Kanazawa H. Kayano T. Futai M. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 102: 172-179
- Machleidt W. Hofner H. Wachter E. (1975)
in Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis (Laursen R.A. ed.) Pierce Chemical Co., Rockford Ill. 17-30
- Machleidt W. Hofner H. (1981)
in High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry (Lottspeich et al. eds.), Berlin New York, de Gruyter 245-258
- MacLennan D.H. Tzagoloff A. (1968)
Biochemistry 7: 1603-1609
- Mahoney W.C. Hermodson M.A. (1979)
Biochemistry 18: 3810-3814
- Mandolino G. deSantis A. Melandri B.A. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 723: 428-439
- Matsubara H. Hase T. Hashimoto T. Tagawa K. (1981)
J. Biochem. 90: 1159-1165
- McCartey R.E. Racker E. (1968)
J. Biol. Chem. 243: 129-137
- McCartey R.E. Fagan J. (1973)
Biochemistry 12: 1503-1507
- Mech C. Jeschkeit H. Schellenberger A. (1976)
Eur. J. Biochem. 66: 133-138
- Meek J.L. Zvani L.R. (1981)
J. Chromatogr. 211: 15-28

- Mirsky R. Barlow V. (1971)
 Biochim.Biophys.Acta 241: 835-845
- Mirsky R. Barlow V. (1972)
 Biochim.Biophys.Acta 274: 886-897
- Mitchell P. (1961)
 Nature 191: 144-148
- Mitchell P. (1966)
 Biol.Rev. 41: 445-502
- Mitchell P. (1968)
 in Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction Bodmin,
 England: Glynn Res. Ltd. 111 ff
- Mitchell P. (1976)
 Biochem.Soc.Trans 4: 399-430
- Mitchell P. (1977)
 FEBS Lett. 78: 1-20
- Moroney J.V. Lopresti L. McEwen B.F. McCartey R.E. Hammes
 G.G. (1983)
 FEBS Lett. 158: 58-62
- Muñoz E. (1982)
 Biochim.Biophys.Acta 650: 233-265
- Nagle J.F. Morowitz H.J. (1978)
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 75: 298-302
- Nalin C.M. Cross R.L. (1982)
 J.Biol.Chem. 257: 8055-8060
- Nelson N. Nelson H. Racker E. (1972)
 J.Biol.Chem. 247: 7657-7662
- Nelson N. Kanner B.I. Gutnick D.L. (1974)
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 71: 2720-2724
- Nelson W. (1976)
 Biochim.Biophys.Acta 456: 314-338
- Nelson N. Eytan E. Notsani B.E. Sigrist H. Sigrist-Nelson K.
 Gitler C. (1977)
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74: 2375-2378
- Nelson N. (1981)
 Curr.Top.Bioenerg. 11: 1-34
- Neupert W. Schatz G. (1981)
 Trends Biochem.Sci. 6: 1-4

- Nielsen J. Hansen F.G. Hoppe J. Friedl P. von Meyenburg K. (1981)
Mol.Gen.Genet. 184: 33-39
- Nieto M. Muñoz E. Carreira J. Andreu J.M. (1975)
Biochim.Biophys.Acta 413: 394-414
- O'Neal C.C. Boyer P.D. (1984)
J.Biol.Chem. 259: 5761-5767
- Oesterhelt D. (1976)
Angew.Chem. 88: 16-24
- Ohta S. Tsuboi M. Yoshida M. Kagawa Y. (1980)
Biochemistry 19: 2160-2165
- Okamoto H. Sone N. Hirata H. Yoshida M. Kagawa Y. (1977)
J.Biol.Chem. 252: 6125-6131
- Ort D.R. (1978)
Eur.J.Biochem. 85: 479-485
- Palmieri F. et al. (1977)
in Structure and Function of Energy-Transducing Membranes
(eds. K. van Dam et al.) Amsterdam Elsevier 251 ff
- Paradies H.H. Zimmermann J. Schmidt U. (1978)
J.Biol.Chem. 253: 8972-8979
- Paradies H.H. (1980)
Biochem.Biophys.Res.Comm. 92: 1076-1082
- Pedersen P.L. (1975)
Bioenergetics 6: 243-275
- Pedersen P.L. Schwerzmann K. Cintron N. (1981)
Curr.Top.Bioenerg. 11: 149-199
- Penefsky H.S. Pullmann M.E. Datta A. Racker E. (1960)
J.Biol.Chem. 235: 3330-3336
- Penefsky H.S. Warner R. (1965)
J.Biol.Chem. 240: 4694-4702
- Penefsky H.S. (1979)
Adv.Enzymol. 49: 223-280
- Penin F. Godinot C. Gautheron D. (1979)
Biochim.Biophys.Acta 548: 63-71
- Peterson G.L. (1979)
Anal.Biochem. 100: 201-220
- Pick U. Racker E. (1979)
J.Biol.Chem. 254: 2793-2799

- Pivel J.P. Muñoz E. Marquet A. (1980)
Biochem.Int. 1: 377-385
- Previero A. Derancourt J. Coletti-Previero M.A. Laursen R.A. (1973)
FEBS Lett. 33: 135-138
- Prochaska L.J. Bisson R. Capaldi R.A. Steffens G.C.M. Buse G. (1981)
Biochim.Biophys.Acta 637: 360-373
- Pullman M.E. Penefsky H.S. Datta A. Racker E. (1960)
J.Biol.Chem. 235: 3322-3329
- Pullman M.E. Monroy G.C. (1963)
J.Biol.Chem. 238: 3762-3768
- Racker E. (1976)
Trends Biochem.Sci. 1: 244-247
- Ramachandran J.K. Witkop B. (1967)
Methods Enzymol. 11: 283-298
- Reindl F. Hoppe W. (1954)
Chem.Ber. 87: 1103-1107
- Robertson R.N. Boardman N.K. (1975)
FEBS Lett. 60: 1-9
- Rosen G. Gresser M. Vinkler C. Boyer P.D. (1979)
J.Biol.Chem. 254: 10654-10661
- Rottenberg H. (1978)
FEBS Lett. 94: 295-297
- Rückel G.L. (1980)
Thesis LMU München
- Rückel G. & Wachter E. (1980)
in Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis (Birch C. ed.) Elsevier, North-Holland Biomedical Press 439-452
- Rüegg U.T. Rudinger J. (1977)
Methods Enzymol. 47: 111-116
- Rydström J. (1977)
Biochim.Biophys.Acta 463: 155-172
- Ryrie I.J. Jagendorf T. (1972)
J.Biol.Chem. 247: 4453-4459
- Ryrie I.J. (1975)
Arch.Biochem.Biophys. 168: 704-711

- Saraste M. Gay N.J. Eberle A. Runswick M.J. Walker J.E. (1981b)
Nuc.Acids Res. 9: 5287-5296.
- Savige W.E. Fontana A. (1977)
Methods Enzymol. 47: 453-459
- Schellenberger A. Graubaum H. Mech C. Sternkop G. (1972)
Z.Chem. 12: 62-63
- Schmidt B. Wachter E. Sebald W. Neupert W. (1984)
Eur.J.Biochem. 144: 581-588
- Schwerzmann K. Hillihen J. Pedersen P.L. (1982)
J.Biol.Chem. 257: 9555-9560
- Sebald W. (1977)
Biochim.Biophys.Acta 463: 1-27
- Sebald W. Wild G. (1979)
Methods Enzymol. 55: 344-351
- Sebald W. Graf T. Lukins H.B. (1979a)
Eur.J.Biochem. 93: 287-299
- Sebald W. Hoppe J. Wachter E. (1979b)
in Function and Molecular Aspect of Biomembrane Transport
(Quagliariello et al eds.) Elsevier Biomedical Press 63-74
- Sebald W. Neupert W. Weiss H. (1979c)
Methods Enzymol. 55: 144-148
- Sebald W. Machleidt W. Wachter E. (1980)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 77: 785-789
- Sebald W. Hoppe J. (1981)
Curr.Top.Bioenerg. 12: 1-64
- Sebald W. Kruse B. (1984)
in H^+ -ATPase (ATP Synthase): Structure, Function, Biogenesis
(Papa S. et al. eds.) Adriatica Editrice, Bari Italy 67-75
- Senior A. Brooks J.C. (1970)
Arch.Biochem.Biophys. 140: 257-266
- Senior A.E. (1979)
in Membrane Proteins in Energy Transduction (ed. Capaldi
R.A.) Marcel Dekker New York Basel 233-278
- Senior A.E. Wise J.G. (1983)
J.Membrane Biol. 73: 105-124
- Serrano R. Kanner B.I. Racker E. (1976)
J.Biol.Chem. 251: 2453-2461

Skulachev V.P. (1978)
FEBS Lett. 87: 171-172

Slater E.C. (1953)
Nature 172: 975-976

Smith J.B. Wilkowski C. (1978)
Fed.Proc. 37: Abstr. 1385

Smithies O. Gibson D. Fanning E.M. Goodfliesh R.M. Gilman
J.G. Ballantyne D.L. (1971)
Biochemistry 10: 4912-4921

Sone N. Yoshida M. Hirata H. Kagawa Y. (1975)
J.Biol.Chem. 250: 7917-7923

Sone N. Yoshida M. Hirata H. Kagawa Y. (1977)
J.Biol.Chem. 252: 376-387

Sone N. Yoshida M. Hirata H. Kagawa Y. (1978)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 75: 4219-4223

Sorgato M.C. Branca D. Ferguson S.J. (1980)
Biochem.J. 188: 945-948

Spitzberg V. Haworth R. (1977)
Biochim.Biophys.Acta 492: 237-240

Sternweis P.C. Smith J.B. (1977)
Biochemistry 16: 4020-4025

Sternweis P.C. (1978)
J.Biol.Chem. 253: 3123-3128

Sternweis P.C. Smith J.B. (1980)
Biochemistry 19: 526-531

Stiggall D.L. Galante Y.M. Hatefi Y. (1978)
J.Biol.Chem. 253: 956-966

Strotmann H. Hesse H. Edelmann K. (1973)
Biochim.Biophys.Acta 314: 202-210

Summers M.R. Smythers G.W. Oroszlan S. (1973)
Anal.Biochem. 53: 624-628

Swank R.T. Munkres K.D. (1971)
Anal.Biochem. 39: 462-477

Takeshige K. Hess B. Böhm M. Zimmermann-Telschou H. (1976)
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 357: 1605-1622

Tamura J.K. Wang J.H. (1983)
Biochemistry 22: 1947-1954

- Teintze M. Neupert W. (1982)
in Cell Membranes: Methods and Reviews (Elson et al. eds)
Plenum Publishing Co. New York 1: 89-114
- Todd R.D. Griesenbeck T.A. Douglas M.G. (1980)
J.Biol.Chem. 255: 5461-5467
- Trebst A. (1974)
Ann.Rev.Plant Physiol. 25: 423-425
- Tzagoloff A. Byington K.H. MacLennan D.H. (1968)
J.Biol.Chem. 243: 2405-2411
- Tzagoloff A. (1969)
J.Biol.Chem. 244: 5020-5026
- Tzagoloff A. Meagher P. (1971)
J.Biol.Chem. 246: 7328-7334
- Tzagoloff A. (1979)
Methods Enzymol. 55: 351-356
- Vambutas V.K. Racker E. (1965)
J.Biol.Chem. 240: 2660-2667
- van Gelder B.F. et al. (1977)
in Structure and Function of Energy-Transducing Membranes
(eds. K.van Dam et al.) Amsterdam Elsevier 61 ff
- Verschoor G.J. van der Sluis P.R. Slater E.C. (1977)
Biochim.Biophys.Acta 462: 438-449
- Viebrock A. Perz A. Sebald W. (1982)
EMBO J. 1: 565-571
- Voelter W. (1981)
in High Performance Liquid Chromatography in Protein and
Peptide Chemistry (Lottspeich et al. eds.), Berlin, New York,
de Gruyter 1-54
- Vogel H.J. (1956)
Microbiol.Genet.Bull. 13: 42ff
- Vogel G. Steinhart R. (1976)
Biochemistry 15: 208-216
- Wachter E. Machleidt W. Hofner H. Otto J. (1973)
FEBS Lett. 35: 97-102
- Wachter E. Werhahn R. (1977)
in Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis (Previero
A. & Coletti-Previero M.A. eds.) Elsevier, North Holland
Biomedical Press 185-192
- Wachter E. Werhahn R. (1979)
Anal.Biochem. 97: 56-64

- Wachter E. Werhahn R. (1980)
in Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis (Birre C.
ed.) Elsevier, North-Holland Biomedical Press 21-33
- Wakabayashi T. Kubota M. Yoshida M. Kagawa Y. (1977)
J.Mol.Biol. 117: 515-519
- Walker J.E. Runswick M.J. Saraste M. (1982a)
FEBS Lett. 146: 393-396
- Walker J.E. Saraste M. Runswick M.J. Gay N.J. (1982b)
EMBO J. 1: 945-951
- Walz D. (1979)
Biochim.Biophys.Acta 505: 279-290
- Webb M.R. Grubmeyer C. Penefsky H.S. Trentham D.R. (1980)
J.Biol.Chem. 255: 11637-11639
- Weber K. Osborn M. (1969)
J.Biol.Chem. 244: 4406-4411
- Weiss H. von Jagow G. Klingenberg E.M. Bücher T. (1970)
Eur.J.Biochem. 14: 75-82
- Weiss M.A. McCartey R.E. (1977)
J.Biol.Chem. 252: 8007-8012
- Wikström M.F. (1976)
FEBS Lett. 65: 259-262
- Wikström M. Krab K. (1978)
in Energy Conservation in Biological Membranes (eds.
G.Schäfer et al.) Berlin Heidelberg New York Springer 128 ff
- Wikström M. Krab K. (1980)
Curr.Top.Bioenerg. 10: 51-101
- Wild G. (1980)
Dissertation LMU München
- Williams R.J.P. (1962)
J.Theor.Biol. 3: 209-229
- Williams R.J.P. (1978)
FEBS Lett. 85: 9-19
- Wilson D.F. Dutton P.L. Wagner M. (1973)
in Current Topics of Bioenergetics (eds. D.R.Sanadi et al.)
New York Academic Press 5: 234 ff
- Wilson D.B. Smith J.B. (1977)
in Bacterial Transport (Rosen ed.) Marcel-Dekker Inc., New
York 495-505

- Wilson K.J. Berchtold M. Honneger H. Hughes G. (1981)
in High Performance Liquid Chromatography in Protein and
Peptide Chemistry (Lottspeich et al. eds.), Berlin, New York,
de Gruyter 159-174
- Wingfield P.T. Boxer D.H. (1975)
Biochem.Soc.Trans. 3: 763-769
- Wong S.Y. Galante Y.M. Hatefi Y. (1982)
Biochemistry 21: 5781-5787
- Wulf R. Kalstein H. Klingenberg M. (1978)
Eur.J.Biochem. 82: 585-592
- Yang C.Y. (1979)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 360: 1673-1675
- Yoshida M. Sone N. Hirata H. Kagawa Y. (1977a)
J.Biol.Chem. 252: 3480-3485
- Yoshida M. Okamoto H. Sone N. Hirata H. Kagawa Y. (1977b)
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74: 936-940
- Younis H.M. Morjana N.A. (1982a)
FEBS Lett. 140: 317-319
- Younis H.M. Morjana N.A. (1982b)
FEBS Lett. 140: 320-324
- Zoratti M. Pietrobon D. Azzone G.F. (1982)
Eur.J.Biochem. 126: 443-451

6. Liste der verwendeten Abkürzungen

A, Ala	Alanin
B, Asx	Asparagin, -säure
C, Cys	Cystein
D, Asp	Asparaginsäure
E, Glu	Glutaminsäure
F, Phe	Phenylalanin
G, Gly	Glycin
H, His	Histidin
I, Ile	Isoleucin
K, Lys	Lysin
L, Leu	Leucin
M, Met	Methionin
N, Asn	Asparagin
P, Pro	Prolin
Q, Gln	Glutamin
R, Arg	Arginin
S, Ser	Serin
T, Thr	Threonin
V, Val	Valin
W, Trp	Tryptophan
Y, Tyr	Tyrosin
Z, Glx	Glutamin, -säure
Hse	Homoserin
Hlc	Homoserinlacton
Nle	Norleucin
Ac-	Acetyl-
ADP	Adenosindiphosphat
APG	Aminopropylglas
ATP	Adenosintriphosphat
BF ₀	F ₀ -Teil bakterieller H ⁺ -ATPasen
Bu-	Butyl-
CF ₁	F ₁ -ATPase aus Chloroplasten
DABITC	4-N,N-dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat
DABTH	Thiohydantoin der DABITC-Derivate
DABTZ	Thiazolinon der DABITC-Derivate
Dansyl-	5-N,N-dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Diethylaminoethan
DITC	Phenylendiisothiocyanat
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDC	1-Ethyl-3-dimethylaminopropylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Et-	Ethyl-
F ₀	Membranteil der H ⁺ -ATPasen
F ₁	wasserlöslicher Anteil der H ⁺ -ATPasen
Fo-	Formyl-

HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
Me-	Methyl-
MF ₁	F ₁ aus mitochondrialen H ⁺ -ATPasen
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (ox. Form)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (red. Form)
NaDodSO ₄	Na-Dodecylsulfat
NBD	4-chloro-7-nitro-2-oxa-1,3-diazol
NBS	N-Bromosuccinimid
o-JBA	ortho-Jodoso-Benzoësäure
OSCP	oligomycin sensitivity conferring protein
P _a	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pr-	Propyl-
PITC	Phenylisothiocyanat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTH	Phenylthiohydantoin
PTZ	Thiazolinonderivat von PITC
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMEDA	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Lebenslauf

- 26.2.49 geboren in Lüdenscheid als erstes von drei Kindern
Eltern: Hans-Peter Werhahn, Fotokaufmann
Helene Werhahn, geb. Cornet
- Apr.1955 Besuch der Volksschule in Lüdenscheid
-Sep.1958
- Sep.1958 Besuch der Volksschule in München
-Sep.1959
- Sep.1959 Besuch des Albert-Einstein-Gymnasiums in München
-Sep.1969
- Okt.1969 Soldat auf Zeit bei der Bundeswehr
-Okt.1971
- Okt.1971 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-
-Dez 1976 Universität in München mit der Diplomhauptprüfung
als Abschluß
- Jan.1977 Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für
-Sep.1977 Physiologische Chemie, Lehrstuhl Prof. Bücher,
Ernennung zum Diplom-Chemiker
- Nov.1977 Untersuchungen zur Trägerkopplung von Proteinen mit
-Dez.1978 C-terminalen Lactonen nach chemischer Spaltung am
Institut für Physiologische Chemie
- Jan.1979 Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Institut für
-Jan.1983 Physiologische Chemie
- Mai 1976 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universi-
-Okt.1983 tät in München, Abschluß mit dem 3. Staatsexamen,
Erhalt der Approbation
- 25.2.1982 Heirat mit Dr. Gerlinde Löhlein, Biochemikerin
- 22.6.1982 Geburt unseres Sohnes Jasper Carl
- ab Assistenzarzt an der Augenklinik rechts der Isar,
Jan.1984 Direktor: Prof. Merté
- 24.9.1987 Geburt unserer Tochter Lynn Helen

